



Obtención de extractos bioactivos a partir de un subproducto del café, empleando técnicas de extracción verdes

Ana Milena Escamilla Santos

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2020**

Obtención de extractos bioactivos a partir de un subproducto del café, empleando técnicas de extracción verdes

Ana Milena Escamilla Santos

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Químicas

Director:

Ph.D. Fabián Parada Alfonso

Co-director:

Ph.D. Andrea del Pilar Sánchez Camargo

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Química de Alimentos-GiQA

COL0004549

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2020

“Lo más interesante en la historia del café es que donde quiera que ha sido introducido ha engendrado revoluciones. Es la bebida más radical, cuya función siempre ha sido la de incitar al pueblo a pensar. Y cuando el pueblo empieza a pensar, es peligroso para los tiranos y los enemigos de la libertad”.

W.K. Ukers

Agradecimientos

A mi Director, el profesor Fabián Parada Alfonso y mi codirectora Andrea del Pilar Sánchez Camargo, por su colaboración, ánimo, paciencia, apoyo incondicional, así como sus palabras y consejos fueron de gran ayuda a seguir adelante, sus enseñanzas y sabiduría me ayudaron a crecer como profesional y como persona.

A los profesores Liliam Palomeque, Blanca Laura Ortiz y Carlos Narváez del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por sus aportes y consejos para el desarrollo de este trabajo.

A la profesora María Cecilia Delgado del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración en el desarrollo de análisis de HPLC.

A los estudiantes y compañeros del Grupo de Investigación en Química de Alimentos: Mabel Martínez, Heiner Toloza, Juan Sebastián Ortiz, Jhonattan Sánchez, Andrés García, Luis Miguel Buelvas, Diego Ballesteros, Jenny Paola Ortiz y Melissa Ramírez, por su conocimiento, apoyo, compañía y momentos de esparcimiento agradables.

Finalmente a mi madre por su infinito cariño, apoyo y comprensión en todos estos años de esfuerzo, a Javier por su amor, fortaleza y palabras de aliento que me ayudaron a no rendirme, a los dos gracias por ser mi soporte y mi norte.

Resumen

En la presente investigación se realizó el estudio comparativo de la composición proximal, contenido total de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, cuantificación de cafeína y ácido clorogénico de dos subproductos de café, como son la cascarilla de café y la película plateada de café, ambos obtenidos del proceso de beneficio del café verde. Luego de esto se escogió el mejor perfil nutricional (13,1% de proteína, 5,2% de ceniza, 73,85% de fibra dietaria total) y el subproducto con mayor cantidad de compuestos bioactivos para ser implementada en la segunda etapa. La película plateada de café fue la seleccionada con el propósito de realizar el proceso de extracción con líquidos presurizados, se realizó un diseño experimental factorial 3^2 (incluyendo 3 puntos centrales), para un total de 13 experimentos donde se estudió el efecto de la temperatura (50, 100, 150 °C), y de la composición del disolvente (0, 50, 100% EtOH:H₂O), sobre el rendimiento de extracción, contenido total de fenoles-CTF, contenido total de Flavonoides-CTFI, y la capacidad antioxidante (por TEAC y por EC₅₀), utilizando como parámetros de extracción una presión de 10,0 MPa, un tiempo de extracción 20 min y una cantidad de muestra de 1,4 g. Los resultados mostraron que la temperatura fue la condición más influyente en la optimización de las variables. Se encontró un punto óptimo de extracción con los valores de rendimiento de extracción de 18,20%, un CTF de 109,34 mg ácido gálico equivalente-AGE/g de extracto ó 1989,98 mg AGE/100 g de muestra, CTFI de 15,51 µg quercetina equivalente-QE/g de extracto ó 0,28 mg de QE/100 g de muestra, y la capacidad antioxidante de 0,99 mmol de trolox equivalente-TE/g de extracto ó 4504,50 mg TE/100 g muestra y un EC₅₀ de 26,74 µg/ml. En la tercera etapa se realizó una extracción sucesiva a las condiciones óptimas de extracción, donde se realizaron ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra evaluando en estas extracciones su rendimiento de extracción, CTF, CTFI y la capacidad antioxidante (medido por las metodologías TEAC y EC₅₀). Se obtuvo como resultado, cuatro ciclos de extracción que mostraron un agotamiento efectivo de la muestra, pasando de un 18,40% de rendimiento de extracción en el primer ciclo a un 1,32% en el cuarto ciclo, así como disminución en las variables de extracción el CTF que paso de 1341,91 a 100,61 mg AGE/100 g de muestra, CTFI que tuvo una variación del 0,23 mg QE/100 g de muestra a 0.01 mg QE/100 g de muestra, una capacidad antioxidante por TEAC de 5078,40 a 281,53 mg TE/100 g de muestra y un aumento de EC₅₀ de 26,79 µg/ml a 39,04 µg/ml.

Palabras clave: Extracción con líquidos presurizados, capacidad antioxidante, película plateada de café, cascarilla de café, extracción por ciclos, análisis proximal.

Abstract

In the present study a comparative study on the proximal composition, the total content of phenolic compounds, the antioxidant activity, and the quantification of caffeine and chlorogenic acid from two coffee by-products was carried out. Those by-products were coffee husk and silver coffee film, both obtained of the process of benefit of green coffee. After, the best nutritional profile was chosen (13,1% protein, 5,2% ash, and 73,85% total dietary fiber) and the by-product with the greatest amount of bioactive compounds to be implemented in the second stage. The silver coffee film was selected for the purpose of carrying out the extraction process with pressurized liquids, a 3^2 factorial experimental design (including 3 central points) was performed, for a total of 13 experiments where the effect of temperature was studied (50, 100, 150 °C), and of the solvent composition (0, 50, 100% EtOH:H₂O), on the extraction yield, total phenols content CTF, total Flavonoid CTFI content, and the antioxidant activity (for TEAC and for EC₅₀) and using as a extraction parameters a pressure of 10,0 MPa, an extraction time 20 min and a sample amount of 1,4 g. It was found that temperature was the most influential condition in the optimization of the variables. An optimal extraction point was found with the extraction yield values of 18,20%, a CTF of 109,34 µg gallic acid equivalent/g extract or 1989,98 µg gallic acid equivalent/100 g sample, CTFI of 15,51 µg quercetin equivalent/g extract or 0,28 mg quercetin equivalent/100 g of sample, and the antioxidant capacity of 0,99 mmol TE/g extract or 4504,50 mg TE/100 g sample and an EC₅₀ of 26,74 µg/ml. In the third stage, a successive extraction at the optimum extraction conditions was carried out. Extraction cycles until deplete the sample, evaluating on these extractions, the extraction yield, CTF, CTFI and antioxidant activity (by TEAC and EC₅₀ methods), were carried out. The results showed that four extraction cycles resulted in the exhaustion of the simple, going from 18,40% in the first cycle to 1,32% in the fourth cycle in the extraction yield, as well as a decrease in extraction variables the CTF of 1341,91 to 100,61 mg of AGE/100 g of sample, CTFI had a variation of 0,23 mg of QE/100 g of sample to 0,01 mg of QE/100 g of sample, the antioxidant capacity of TEAC of 5078,40 to 281,53 mg of TE/100 g of sample and the EC₅₀ de 26,79 µg/ml a 39,04 µg/ml.

Keywords: Pressurized liquids extraction, antioxidant activity, silverskin coffee, parchment coffee, extraction by cycles, proximal analysis.

Contenido

Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
Introducción.....	14
1. Residuos agroindustriales del café como fuente promisoría de compuestos bioactivos y su valorización.....	17
1.1 El café.....	17
1.1.1 Fisiología del café.....	18
1.1.2 Subproductos del beneficio del café.....	18
1.1.3 Cascara de Café (CC).....	20
1.1.4 Película plateada de café (PP).....	20
1.2 Compuestos bioactivos y actividad antioxidante.....	21
1.3 Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos.....	24
1.4 Métodos de extracción.....	27
1.5 Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	29
Referencias.....	33
2. Caracterización química y proximal de dos biomásas de café: estudio comparativo.....	37
2.1 Introducción.....	37
2.2 Materiales y métodos.....	38
2.2.1 Material Vegetal.....	38
2.2.2 Determinación de la composición química.....	38
2.2.3 Extracción sólido-líquido convencional.....	38
2.2.4 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos (CTF).....	39
2.2.5 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por método TEAC.....	39
2.2.6 Extracción y cuantificación de cafeína y ácido clorogénico.....	40
2.2.7 Análisis estadístico.....	40
2.3 Resultados y discusión.....	40

2.3.1	Determinación de la composición química.....	40
2.3.2	CTF y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de CC y PP.....	42
2.3.3	Determinación de CGA y de cafeína.....	43
2.4	Conclusiones.....	45
Referencias.....		46
3.	Obtención de extractos de la película plateada de café con potencial bioactivo, por medio de extracción con líquidos presurizados.....	48
3.1	Introducción.....	48
3.2	Materiales y métodos.....	49
3.3	Resultados y discusión	52
3.4	Conclusiones.....	61
Referencias.....		62
4.	Extracciones sucesivas realizadas a la película plateada de café para lograr su agotamiento.....	64
4.1.	Introducción.....	64
4.2.	Materiales y métodos.....	65
4.3.	Resultados y discusiones	65
4.4.	Conclusiones.....	71
Referencias.....		72
5.	Conclusiones generales	74
6.	Recomendaciones	75
Anexos.....		77

Lista de Figuras

Figura 1-1. Partes del fruto de café.....	18
Figura 1-2. Compuestos fenólicos A) fenoles simple, B) ácidos fenólicos C) cumarinas D) Flavonoides	23
Figura 1-3. Estructura de ácido clorogénico y ácido cafeico.	23
Figura 1-4. Principales compuestos presentes en el café.	24
Figura 1-5. Mecanismo de acción de la transferencia de electrones en DPPH con ácido gálico.	26
Figura 1-6. Reacción de reducción producida en el ensayo TEAC.....	27
Figura 1-7. Diagrama de fases para una sustancia pura.....	29
Figura 1-8. Cambios de la constante dieléctrica del agua a distintas temperaturas.	30
Figura 1-9. Equipo de extracción de líquidos presurizados	31
Figura 2-1. Perfil cromatográfico a 280 nm de A) CC y B) PP.....	44
Figura 3-1. Diagrama de Pareto Estandarizado para Rendimiento	53
Figura 3-2. Diagramas de Pareto Estandarizado (A) y Superficie de respuesta (B) para la variable de respuesta CTF.....	57
Figura 3-3. Diagramas de Pareto Estandarizado para CTFI.....	57
Figura 3-4. Diagramas de Pareto Estandarizado para las variables de respuesta TEAC (A) y EC ₅₀ (B).....	58
Figura 3-5. Superficie de respuesta para la variable de respuesta TEAC.....	59
Figura 4-1. Rendimiento acumulado de extracción vs ciclo de extracción.	66
Figura 4-2. Contenido total de fenoles en la PP respecto al tiempo de extracción	68
Figura 4-3. Contenido total de flavonoides en la PP respecto al tiempo de extracción.	68
Figura 4-4. Capacidad antioxidante por método EC ₅₀ vs tiempo de extracción.	69
Figura 4-5. Capacidad antioxidante por el método TEAC vs tiempo de extracción.	70

Lista de Tablas

Tabla 1-1. Subproductos generados de la industria de 1 kg de fruto de café.....	19
Tabla 1-2. Clasificación de compuestos fenólicos	22
Tabla 2-1. Análisis proximal de cascarilla y película plateada de café.....	41
Tabla 2-2. Caracterización de los extractos convencionales de CC y PP.....	42
Tabla 2-3. Contenido de CGA y de cafeína en CC y PP.....	43
Tabla 3-1. Condiciones de extracción dadas por el diseño experimental.....	50
Tabla 3-2. Variables de extracción y su respectivo modelo cuadrático.	52
Tabla 3-3. Rendimiento, CTF, CTFI y capacidad antioxidante in vitro de los extractos PLE obtenidos de la PP.....	54
Tabla 3-4. Datos obtenidos CTF, CTFI y TEAC en extractos PLE obtenidos de PP.	55
Tabla 3-5. Valores estimados y valores experimentales obtenidos en la validación de la optimización del diseño experimental.....	60
Tabla 4-1. Rendimientos obtenidos en las extracciones sucesivas	66
Tabla 4-2. Contenido total de compuesto fenólicos y flavonoides en extracciones sucesivas.	67
Tabla 4-3. Capacidad antioxidante evaluada por EC ₅₀ y TEAC.....	69

Abreviaturas

ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AGE	Equivalentes de ácido gálico
CC	Cascarilla de café
CTF	Contenido total de fenoles
CTFI	Contenido total de flavonoides
CQA	Ácido Clorogénico
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
EtOH	Etanol
EC ₅₀	Concentración media máxima que inhibe el 50% del radical DPPH
H ₂ O	Agua
HAT	Transferencia de átomos de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
MeOH	Metanol
Pc	Presión crítica
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PP	Película Plateada de café
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
Tc	Temperatura crítica
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
QE	Quercetina equivalente

Introducción

El café es uno de los productos más relevantes en el dinamismo de la economía colombiana, puesto que genera 800 mil empleos directos y cerca de 1,6 millones de empleos indirectos durante toda su cadena productiva (1). Además, Colombia se encuentra en el tercer puesto de exportación de café a nivel mundial, con un indicador para el año 2018 de 12,8 millones de sacos e ingresos por 1,628 millones de dólares (2,3). El manejo adecuado de los subproductos agroindustriales de este proceso productivo es importante, ya que la cantidad de desechos que se generan son elevados. La mayoría de estos subproductos del beneficio de la semilla del café no son adecuadamente gestionados y en algunos casos son usados como abono o como alimento para animales. Sin embargo, son una fuente poco explorada de compuestos bioactivos, convirtiéndolos en biomásas con potencial alimentario (4).

Los subproductos de café tienen un importante contenido de cafeína, ácido clorogénico, polifenoles y taninos, que al no ser dispuestos adecuadamente generan contaminación (5). Por otra parte, éstos no representan riesgo para el ser humano, en dosis adecuadas, siendo por el contrario, moléculas bioactivas de interés para la salud. Por ejemplo la cafeína genera menor riesgo de contraer obesidad y diabetes (6), reduce los síntomas de Parkinson y Alzheimer (7) y el ácido clorogénico, es un hepatoprotector, antioxidante y anticancerígeno (4), entre otros beneficios.

Dentro de los subproductos del café se encuentra la cascarilla de café (CC) y la película plateada (PP), éstas son subcapas de la semilla del café; la primera se obtiene luego de someter el café pergamino al proceso de trilla (con la trilla se genera el café verde y la CC) y la segunda durante el proceso de tostión del café verde. Estos dos subproductos han sido poco estudiados, la CC posee un alto contenido de fibra dietaria total, al igual que la PP que además posee propiedades antioxidantes que la hacen una candidata ideal para ser estudiada y usada como alimento funcional (8). Por otra parte, se pretende aportar al desarrollo de alimentos funcionales que ayuden a mejorar la salud humana. Para lograr esto, en la literatura especializada se encuentran numerosos trabajos en los que, empleando técnicas verdes de extracción se obtienen extractos enriquecidos en compuestos bioactivos. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) son técnicas emergentes de extracción en las que se emplean disolventes tipo GRAS (*Generally Recognized as Safe*), que mejoran el rendimiento de extracto, generan pocos residuos y producen tortas de extracción inocuas, las cuales pueden ser utilizadas por la industria de alimentos (9,10).

Por lo anterior, y considerando el equipamiento y experticia del GiAQ, el objetivo de este trabajo fue evaluar la composición química de la cascarilla y de la película plateada de café, seleccionando la biomasa más promisoría para una etapa posterior de extracción. En dicha etapa se procedió a obtener extractos con capacidad antioxidante *in vitro* empleando como técnica verde PLE. Con ello se propone aportar a la valorización de un residuo generado por una de las industrias más relevantes para la economía colombiana, obteniendo una torta de extracción inocua. Lo cual podría generar valor agregado a la cadena productiva del café.

El presente proyecto de investigación se desarrolló en tres fases, a saber: (i) Pretratamiento y análisis preliminares de los subproductos de café (CC y PP), determinando macro-componentes en las biomásas, así como contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* y (ii) Obtención de extractos por medio de líquidos presurizados, a partir de la biomasa más promisoría, evaluando las mejores condiciones de temperatura y porcentaje de disolvente, y midiendo como variables de respuesta a) el rendimiento de extracción, b) el contenido total de compuestos fenólicos, c) el contenido total de flavonoides, d) la capacidad antioxidante *in vitro* por métodos TEAC y valor EC_{50} , usando los radicales ABTS y DPPH, respectivamente. (iii) Por último, una vez conocidas las condiciones óptimas que maximizan las variables medidas, se realizó un proceso de agotamiento de la muestra mediante ciclos sucesivos de extracción por PLE.

De esta manera, la presente tesis de maestría es presentada en cuatro capítulos. En el primer capítulo se presenta el estado de arte relativo al café, sus principales compuestos bioactivos, la extracción con líquidos presurizados y los mecanismos de capacidad antioxidante empleados. En el segundo capítulo se presenta el análisis proximal realizado a dos biomásas de café con el fin de identificar la más promisoría, según el perfil nutricional. En el capítulo tres se presenta lo relacionado con la obtención de extractos por PLE a partir de la biomasa más promisoría, teniendo como resultado las mejores condiciones de extracción (composición de la fase extractante y temperatura de extracción) según las variables respuesta (el rendimiento de extracción, el contenido total de fenoles, y de flavonoides, y capacidad antioxidante *in vivo*). En el último capítulo se determinó el número de ciclos de extracción requeridos para agotar la muestra. Por último se exponen las conclusiones generales del trabajo, algunas recomendaciones producto de la investigación y se presentan los anexos. En el anexo A se numeran los productos académicos mediante los cuales se divulgó los resultados obtenidos y en los Anexos B y C se incluyen información complementaria del trabajo.

1. Residuos agroindustriales del café como fuente promisoría de compuestos bioactivos y su valorización

En el presente capítulo se discuten los aspectos más relevantes que definen y contextualizan el trabajo de maestría “Obtención de extractos bioactivos a partir de un subproducto del café, empleando técnicas de extracción verdes”. Inicialmente se describe el café, sus partes, proceso de beneficio y los subproductos que se producen en cada una de las etapas de beneficio. Posteriormente se enfoca en dos subproductos de café, la cascarilla y la película plateada del café, su importancia nutricional y cualidades. Luego se hace una revisión de los métodos de extracción, donde se describe lo más relevante de la extracción con líquidos presurizados, como técnica verde de extracción. Finalmente, con base en el estado actual del tema se presentan los objetivos del trabajo.

1.1 El café

El café pertenece a la familia de las Rubiáceas, género *Coffea*, y es un cultivo propio de países tropicales o subtropicales (11). A nivel mundial las especies más importantes, por su sabor y aroma, son arábica (*Coffea arabica*), con un 75% aprox. del área cultivada, y robusta (*C. canephora*), con un 24% aprox. de área cultivada (8,12).

Cerca de 60 países producen café en gran medida, este cultivo es de importancia económica relevante, ya que involucra grandes negocios a nivel mundial y genera un número importante de empleos (8). El café es una de las bebidas más populares y consumida a diario por millones de personas, convirtiéndolo así en el segundo producto más comercializado, después del petróleo (13).

Colombia es el tercer exportador de café del mundo con un 9% de la producción mundial (14), produciendo café de tipo arábico, el cual se caracteriza por ser suave y tener delicado aroma. Algunas variedades de café que se presentan en nuestro país son Maragogipe, Borbón, Tabi, Típica, Caturra y Colombia (15).

A continuación se describen las partes que componen el fruto del café, los subproductos asociados a su beneficio y en particular la cascarilla y la película plateada del café.

1.1.1 Fisiología del café.

El fruto de café, también llamado cereza o baya, se divide en siete partes, como se muestra en la **Figura 1-1**. Primero se encuentra el pericarpio suave y resistente, cuyo color cambia dependiendo de la maduración del fruto; luego está el mesocarpio o pulpa, de color blanco-amarillento, cuya composición es fibrosa y dulce. En seguida, el mucilago, una capa delgada de pectina traslúcida, incolora y viscosa; posteriormente se encuentra el endocarpio (también llamado pergamino) de color amarillento. Luego se encuentra el tegumento (piel o película plateada) que cubre cada hemisferio del grano de café, y finalmente está el endosperma o grano de café (8,12). Los primeros seis conforman subproductos, cuya disposición implica el uso de recursos económicos y ambientales.



Figura 1-1. Partes del fruto de café (16).

1.1.2 Subproductos del beneficio del café.

La sostenibilidad de la industria agroalimentaria depende en gran medida del buen uso de sus subproductos. Para ello, es importante implementar prácticas sostenibles que se puedan incluir en la cadena de suministros, para así mejorar las condiciones de origen, reducir las emisiones, reciclar los materiales, desarrollar instalaciones ecológicas y/o diseñar nuevos productos a partir del aprovechamiento de estos subproductos (17).

La industria del café es responsable de la generación de cantidades importantes de subproductos (residuos) que ocasionan un peligro de contaminación si son dispuestos en el medio ambiente sin un previo tratamiento (17,18). Estos subproductos, son ricos en carbohidratos, proteínas, pectinas, compuestos bioactivos como polifenoles, entre otros (13).

En la **Tabla 1-1**, se muestran las pérdidas generadas a lo largo del proceso de beneficio del café, en el cual se desecha más del 90% del fruto o cereza, a continuación se describen algunos subproductos:

- La piel y pulpa de café constituyen cerca del 45% del peso seco del fruto o cereza, siendo el primer y más abundante subproducto del beneficio, el cual genera, en el proceso del despulpado, donde la pulpa es retirada a presión (19). Está compuesta principalmente por carbohidratos, proteínas, minerales, polifenoles, taninos, cianidinas y cafeína (13,17,20).
- El mucílago y los azúcares solubles que se producen por fermentación natural del grano despulpado, en un periodo de 12-18 h, equivalen al 25% aprox. del peso seco del café (8), y son removidos por lavado (19). El café lavado y secado se conoce como café pergamino.
- El café pergamino sometido al proceso de trilla genera el café verde (que es el que se tuesta) y la cascarilla o endocarpio que representa cerca del 4% del peso seco del fruto de café; esta está compuesto por cenizas, proteína, carbohidratos, celulosa, lignina y hemicelulosa (13,17).
- Por último la película plateada de café constituye menos del 3% del peso seco de la cereza de café y es retirada en el proceso de tostado. Esta posee un alto contenido de fibra dietaria total, azúcares, polisacáridos, proteínas, grasas y cenizas; además posee una alta capacidad antioxidante, debido al contenido de compuestos fenólicos y melanoidinas generadas durante la tosti3n (8,12,13,17,21).

Tabla 1-1. Subproductos generados de la industria de 1 kg de fruto de café.

Etapas/proceso	Pérdida (g)	Residuo obtenido
Despulpado	394	Pulpa fresca
Desmucilaginado	216	Mucílago
Trilla	35	Cascarilla o Pergamino
Secado	171	Agua
Torrefacci3n	22	Película plateada
Preparaci3n de bebida	104	Borra
Pérdida total	942	

Cabe anotar que la Federaci3n Nacional de Cafeteros adquiere café pergamino y exporta café verde.

1.1.3 Cascarilla de Café (CC)

La cascarilla de café (CC) es un endocarpio fibroso y fuerte que cubre ambos hemisferios de la semilla de café y los separa el uno del otro, está formada por alfa-celulosa (40-49%) hemicelulosa (25-32%), lignina (33-35%) y cenizas (0,5-1%) (17,22). La CC se retira luego de secar el grano, permitiendo que se recolecte y se use por separado de otros subproductos (8). Existen dos procedimientos o vías para retirar la CC (seca y húmeda), la vía seca en donde se separa la cascarilla de los granos de café verde junto con la piel y la pulpa, y el proceso por vía húmeda en donde la cascarilla se elimina después del secado y está queda aislada, permitiendo así recolectar ese subproducto (23).

Por cada 60 kg de café que se produce, se generan alrededor de 11 kg de CC. Sin embargo es poco estudiada a pesar de las propiedades funcionales que puede tener, dado que contiene compuestos fenólicos y cafeína (22,23).

1.1.4 Película plateada de café (PP)

La película plateada (PP) es un tegumento delgado y adherido a los granos de café, que se separa del grano por medio de un flujo de aire caliente, siendo el único subproducto del proceso de tostado o torrefacción del café (24–26). Es una biomasa interesante ya que se desprende de los granos durante la expansión de éstos al ser sometidos a altas temperaturas (27). Este proceso de tostado provoca una serie de cambios en el grano, ya que algunos compuestos se degradan o modifican, dando como resultado el desarrollo del aroma, sabor y color característicos (8). Es por esto que algunas de las propiedades del café también se mantienen en la PP (25).

La PP actualmente se utiliza como combustible o fertilizante, sin embargo otras formas de valorización de esta biomasa pueden conducir a productos con propiedades saludables, gracias a su capacidad antioxidante, actividad antibacteriana y anticancerígena, entre otras (25). La PP posee un alto contenido de fibra dietaria (68-80%), la cual contiene, fibra soluble (15%) y fibra insoluble (85%). Su contenido de azúcar varía entre 1,6-12%, el contenido de proteínas entre 16,2-19%, grasas de 1,6-3,3%, cenizas de 5-7% y humedad entre el 5-7% (12,24,25,28). Asimismo presenta una capacidad antioxidante alta, lo que hacen de la PP una candidata ideal para ser empleada en alimentos, ya que, es una fuente natural de compuestos bioactivos, susceptibles de ser separados o concentrados (24).

1.2 Compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Los compuestos bioactivos o nutraceuticos, son aquellos esenciales y no esenciales que se producen en pequeñas cantidades en los alimentos y se consideran como ingredientes no nutritivos pero fundamentales para la salud humana (29,30).

En los últimos años el interés por la investigación y consumo de compuestos bioactivos ha aumentado ampliamente (31), ya que son valorados por la industria farmacéutica (en la obtención de medicamentos quimioterapéuticos) o por la industria alimentaria (incluidos en alimentos funcionales). En el último caso el consumo de compuestos bioactivos podría ayudar a atenuar o prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, Alzheimer (30,31), entre otras.

Como fuentes importantes de compuestos bioactivos están las frutas, verduras, legumbres, granos enteros, algas, etc. (31). Los terpenoides (carotenoides y esteroides); compuestos fenólicos y compuestos azufrados, han sido catalogados como los tres grandes grupos de compuestos que representan los compuestos bioactivos. Entre estos, los compuestos fenólicos son de gran interés, dado que aportan a actividad antioxidante y en algunos casos ayudan a la prevención de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y procesos inflamatorios (29). Asimismo están asociados con una menor incidencia de cáncer en humanos y en la prevención de enfermedades como la obesidad, siendo directamente relacionada con el contenido de ácidos clorogénicos y la quercetina, dos compuestos presentes en el té verde y el café (31–33).

Los compuestos fenólicos son una clase heterogénea de metabolitos secundarios, los cuales juegan un papel importante en la fisiología de las plantas, ya que contribuyen al crecimiento, reproducción y en la protección contra patógenos y el estrés por radiación UV (32,33). Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides, polifenoles, entre otros (ver **Tabla 1-2**). Uno de los compuestos fenólicos más estudiados son los flavonoides, los cuales se dividen en antocianinas, flavanoles, flavonoles, flavonas, flavononas e isoflavonas (29,34–36) Ejemplos de algunos compuestos fenólicos se pueden observar en la **Figura 1-2**.

En el caso del café se pueden encontrar algunos compuestos fenólicos de interés no solo para la planta sino para la salud humana. En la **Figura 1-3**, se observa dos de los compuestos fenólicos más reconocidos en el café. Los compuestos fenólicos encontrados en el café son formados por la esterificación de ácidos (-) quínicos con ácidos cinámicos tales como el ácido cafeico, ferúlico y p-

cumarico, algunos derivados de estos ácido presentes en el café se pueden observar en **Figura 1-4**.

Tabla 1-2. Clasificación de compuestos fenólicos (37).

Estructura	Clase
C₆	Fenoles simples
C₆C₁	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
C₆C₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C₆C₃	Ácidos cinámicos, cinamaldehído y alcohol cinámico
C₆C₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C₁₅	Chalconas, auronas y dihidrochalconas
C₁₅	Flavonas
C₁₅	Flavanonas
C₁₅	Flavanonoles
C₁₅	Antocianidinas
C₁₅	Antocianinas
C₃₀	Biflavonilos
C₆C₁C₆, C₆C₁C₆	Bensofenonas, xantonas y estilbenos
C₆C₁₀C₁₄	Quinonas
C₁₈	Betacianinas
Lignanos	Dímeros o oligómeros
Neolignanos	Dímeros o oligómeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobafenos	Polímeros

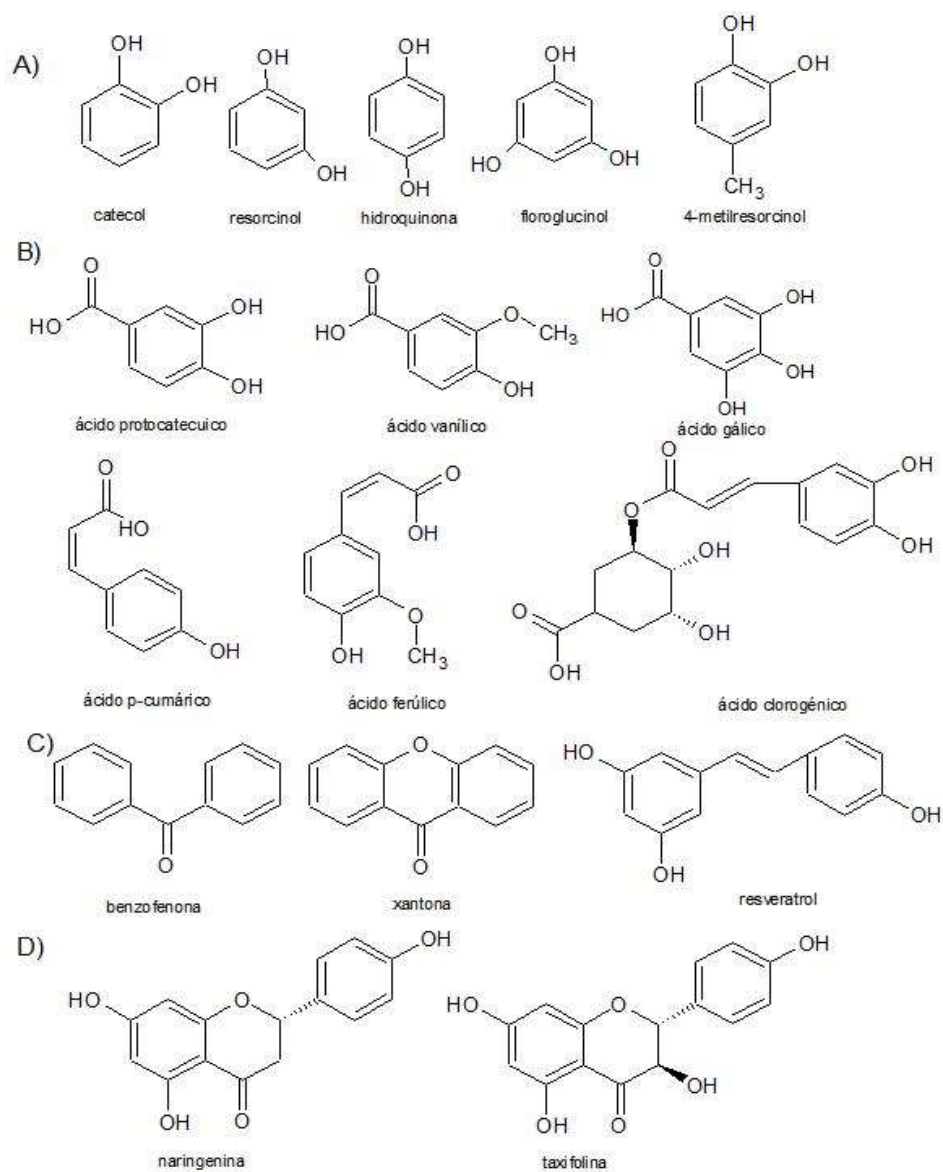


Figura 1-2. Compuestos fenólicos A) fenoles simple, B) ácidos fenólicos C) cumarinas D) Flavonoides

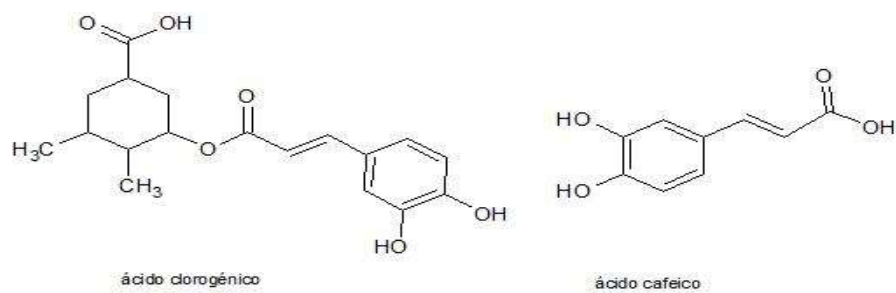


Figura 1-3. Estructura de ácido clorogénico y ácido cafeico (38).

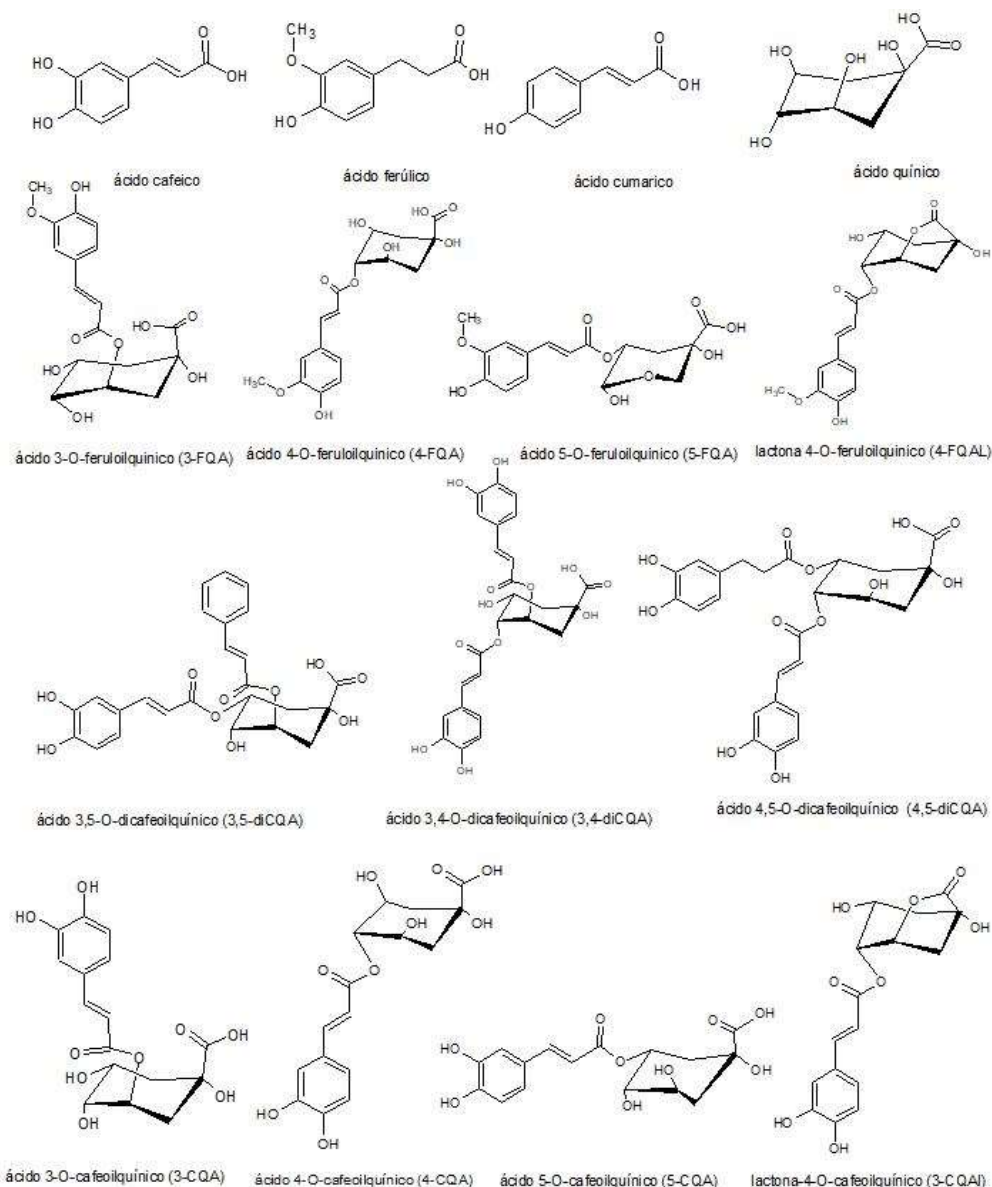


Figura 1-4. Principales compuestos presentes en el café (39).

1.3 Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos

Los procesos de oxidación son necesarios y espontáneos en los seres vivos (proceso de desarrollo) y los alimentos (proceso de evolución y degradación) y se ven afectados por la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, cuyo desbalance produce generalmente afectaciones o cambios por oxidación (40). La defensa de las plantas o el cuerpo para reducir tal desbalance son los compuestos denominados antioxidantes, las cuales poseen una actividad antioxidante, previniendo los cambios por oxidación de un sustrato oxidable, actuando

como donador de electrones.

En el caso de los alimentos, los compuestos antioxidantes son sustancias que disminuyen la extensión de reacciones de oxidación causadas por el oxígeno atmosférico y sustancias orgánicas provocando cambios en sus atributos de calidad. La acción oxidativa causada por los radicales libres puede ser neutralizada mediante el uso de antioxidantes naturales o sintéticos.

Los antioxidantes están presentes en fuentes naturales (frutas, verduras, hierbas, algas, especias, entre otros), y son compuestos o sistemas que retrasan la autooxidación al inhibir la formación de radicales libres o al interrumpir la propagación del radical libre por uno o varios mecanismos (41).

Dentro de los compuestos antioxidantes se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides y tocoferoles, estos actúan como agentes reductores en algunos casos, donde donan hidrogeno e inhibe el oxígeno. También pueden actuar extrayendo o donando electrones, dando lugar a radicales aniónicos y catiónicos que reaccionan con oxígeno u otras moléculas.

Por ejemplo los carotenoides (β -caroteno) actúan estabilizando los radicales libres del oxígeno singlete, convirtiéndolo así en su forma menos reactiva (triplete), mientras que los flavonoides donan electrones o átomos de hidrogeno. En el caso de las vitaminas (vitamina C), su potencial antioxidante se caracteriza por su capacidad donadora de electrones e hidrogeno adquiriendo un estado más estable (29,40,42).

A nivel celular varios compuestos antioxidantes pueden estabilizar o desactivar los radicales libres, previniendo un daño a las estructuras celulares. Como lo expresa Cárdenas y colaboradores., (2016) “La actividad antioxidante es extremadamente importante para la protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. La capacidad antioxidante de los alimentos está determinada por una mezcla de compuestos antioxidantes con diferentes mecanismos de acción que se puede unir a polímeros biológicos, como enzimas transportadores de hormonas y ADN permitiéndole generar una quelación con iones metálicos transitorios, tales como hierro, cobre y zinc. Así mismo, catalizando el transporte de electrones y depurando radicales libres.” Para lograr determinar la actividad antioxidante de los alimentos es importante validarla con más de un método, ya que su compleja naturaleza fitoquímica y sus interacciones, hacen que el usar un solo método no sea tan fiable, de esta manera se logra cuantificar mejor la capacidad antioxidante que poseen los compuestos antioxidantes (vitaminas, carotenoides, polifenoles, entre otros) presentes en un alimento (30).

Es por esto que se ha visto necesidad de realizar diversas técnicas o métodos que expresen la acción antioxidante de diversos medios. A continuación, se hará referencia a dos métodos comúnmente utilizados para medir la capacidad antioxidante *in vitro*, los cuales fueron elegidos debido a la fácil reproducibilidad y complementariedad que existen entre los dos:

- **Medición de la capacidad de captura del radical DPPH**

Este es un ensayo de uso frecuente que está basado en la transferencia de electrones por medio del mecanismo transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) que es de una vía de reacción. La técnica consiste en la medición de la reducción del radical cromógeno DPPH (2,2 difenil-1-Picril Hidrazilo) el cual es estable y de color morado intenso. En este ensayo como ya se mencionó se produce una donación de electrones antioxidantes (AH) u otro radical (R^*) para neutralizar el radical DPPH. El electrón desapareado es estabilizado en presencia de antioxidantes primarios, lo cual va acompañado de una decoloración estequiometrica con respecto al número de electrones donados como se observa en la **Figura 1-5**. La decoloración se mide a una longitud de onda de 517 nm; la variación de coloración actúa como un indicador de la eficacia antioxidante y se reporta como el valor EC_{50} que es la concentración del antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (43–45). Como explica Jiménez y colaboradores (2005) “La interacción entre el DPPH y el potencial antioxidante, depende de su conformación estructural con requerimientos relacionados con la presencia de grupos hidroxilo y estructuras que soportan el radical libre recientemente formado” (45).

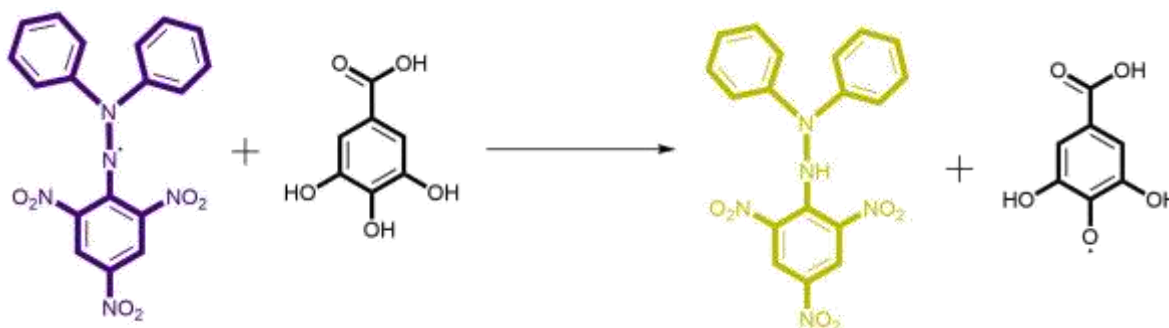


Figura 1-5. Mecanismo de acción de la transferencia de electrones en DPPH con ácido gálico.

- **Medición de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, en inglés) por reacción con el radical ABTS**

Este método está basado en la capacidad de los compuestos para atrapar el radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de aminio)). Este es un método de transferencia de electrones con un mecanismo HAT.

El ensayo específico empleado es el de la actividad antioxidante de una sustancia dada en comparación con el equivalente Trolox (TEAC), donde se mide la capacidad para eliminar el catión radical estable $ABTS^{\cdot+}$ que es un cromóforo azul verde con absorbancia en una longitud de onda de 734 nm. En presencia de antioxidantes, éste disminuye su intensidad, neutralizando el catión por extinción de radicales, por medio de donación de átomos de hidrogeno o por donación de electrones (ver **Figura 1-6**). Los resultados obtenidos en este ensayo se reportan como equivalentes Trolox (43,46).

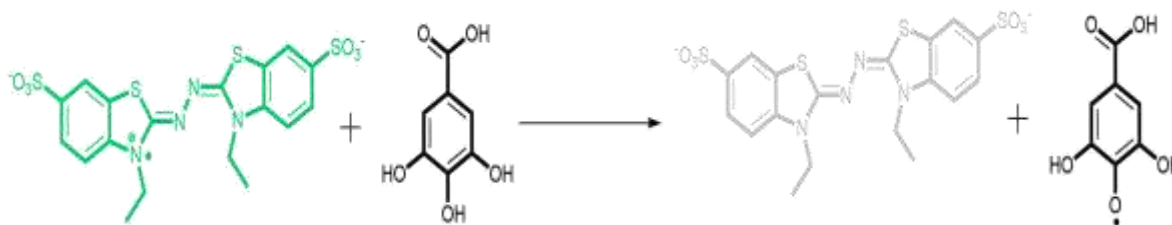


Figura 1-6. Reacción de reducción producida en el ensayo TEAC.

1.4 Métodos de extracción

La extracción de productos naturales es un proceso influenciado por distintos factores, entre los cuales están: la presión, la temperatura, el tipo de disolvente y el tamaño de partícula. Dependiendo de la técnica de extracción o el objetivo de ésta, se puede emplear distintas condiciones de operación, donde es posible modificar los factores antes mencionados (11,47).

Existen distintos métodos para extraer compuestos bioactivos de las plantas o alimentos y dentro de éstos podemos encontrar: i) métodos tradicionales o convencionales y los métodos no tradicionales o emergentes, en modo ii) dinámico y estático, empleando la iii) extracción exhaustiva o no-exhaustiva.

Los métodos tradicionales o convencionales de extracción, son aplicados generalmente en matrices sólidas. Estos métodos requieren altos tiempos de residencia, el uso de calor o agitación y grandes cantidades de disolventes, donde la selección de este depende de su polaridad, de la disponibilidad y del punto de ebullición.

Existen varias técnicas disponibles de extracción sólido - líquido, donde las más comúnmente usadas son extracción Soxhlet, y maceración (34,47,48). El empleo de métodos convencionales de extracción requiere la eliminación posterior del disolvente por destilación/evaporación, lo cual implica tiempo y energía. Estos disolventes también poseen baja selectividad y pueden ocasionar la descomposición de compuestos termolábiles y adicionalmente, se cuestiona la seguridad de estos disolventes residuales en los productos finales (33,34). Por lo cual su uso en las industrias farmacéuticas, cosmética y alimentaria puede estar restringido.

Por otra parte, los métodos de extracción emergentes o no tradicionales tienen como propósito reducir el tiempo de extracción, disminuir la cantidad de disolvente usado, aumentar el rendimiento o la selectividad de la extracción, mejorar la calidad del extracto o emplear disolventes no convencionales (48). Entre los métodos emergentes de extracción se encuentran: la extracción asistida con ultrasonido, con microondas, con enzimas, la extracción líquidos presurizados y la extracción con fluidos supercríticos (48).

Estas dos últimas se encuentran entre las tecnologías que emplean fluidos presurizados. La extracción con fluidos supercríticos (SFE, del inglés), es un método de extracción que emplea un fluido en condiciones por encima de su presión crítica (P_c) y de su temperatura crítica (T_c) como disolvente (ver **Figura 1-7**). Bajo estas condiciones de presión y temperatura presenta el comportamiento de un líquido, con una solubilidad cercana a la fase líquida, con alta difusividad y baja viscosidad, lo que favorece la penetración de una matriz sólida, aumentando la velocidad de extracción y separación de fases (48–50).

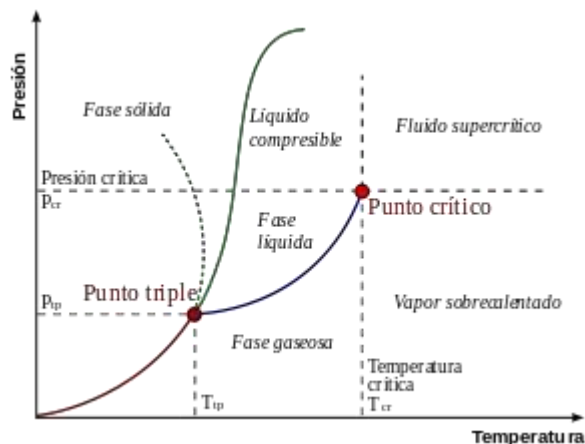


Figura 1-7. Diagrama de fases para una sustancia pura.

Dadas las particularidades del presente trabajo, se hará referencia a la extracción con líquidos presurizados (PLE), ya que fue empleada para el desarrollo de la etapa de obtención de extractos bioactivos a partir de un subproducto de café.

1.5 Extracción con líquidos presurizados (PLE)

En 1995 Dionex Corporation, introdujo el PLE en la conferencia de Pittcon, llamándola Tecnología Acelerada de Extracción con Disolventes (ASE). En la actualidad ésta es conocida también como extracción de líquidos a presión, extracción con disolvente presurizado o extracción acelerada de disolventes (32). Dicha técnica es muy eficiente en la extracción de un amplio rango de compuestos bioactivos de fuentes naturales (51). El uso de esta es cada vez más aceptada a nivel mundial, debido a su fácil manipulación, corto tiempo de extracción, bajos requisitos de cantidad de muestra y altos rendimientos (10).

La PLE es una técnica que se basa en permitir el ajuste de parámetros fisicoquímicos del disolvente (densidad, difusividad, poder de solvatación, viscosidad, constante dieléctrica entre otros) en función de líquidos a presión y temperaturas elevadas (35–200 bar; desde temperatura ambiente hasta 200 °C) por debajo de su punto crítico, para así mejorar la solubilidad y transferencia de masa (32,52).

El agua como disolvente llama la atención debido a la modificación de sus propiedades físico-químicas, que se produce cuando ésta se somete a altas temperaturas y presiones. Cuando se emplea agua como disolvente, el parámetro que más influye en la extracción es su constante dieléctrica (ϵ).

Cuando el agua se calienta bajo suficiente presión de manera que se mantiene su estado líquido, su constante dieléctrica sufre una disminución drástica, pasando a tener valores similares al etanol o a disolventes apolares, ver **Figura 1-8** (53). Por tanto, bajo estas condiciones (alta presión y alta temperatura, inferiores a sus valores críticos P_c : 22 MPa y T_c : 374 °C), el agua logra disolver compuestos de polaridad intermedia o baja (9).

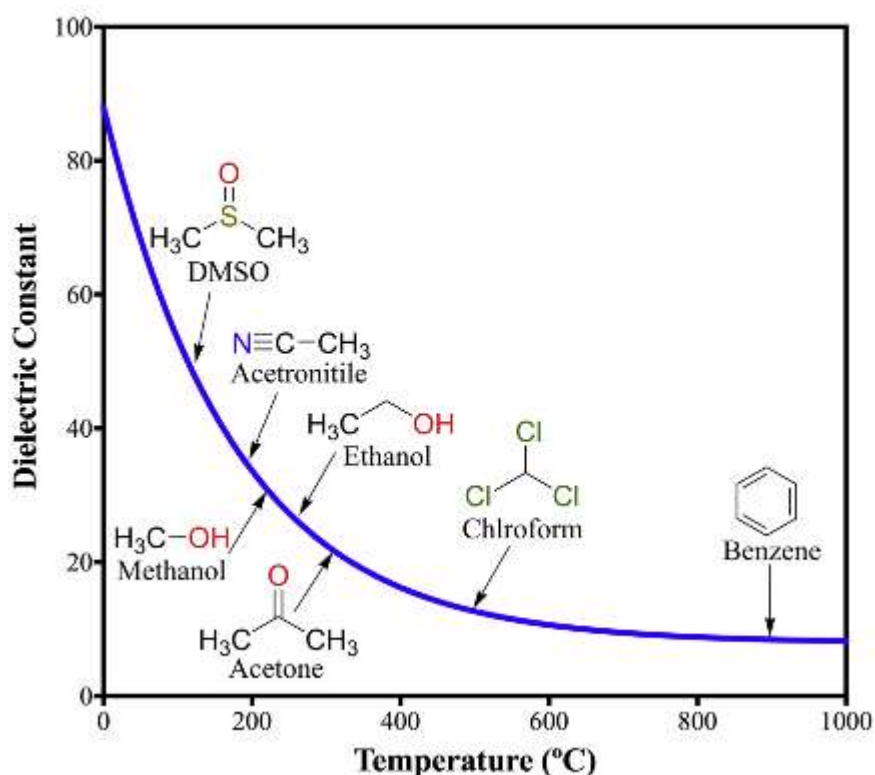


Figura 1-8. Cambios de la constante dieléctrica del agua a distintas temperaturas.

El equipamiento básico de un sistema PLE (ver **Figura 1-9** (40)), consta de un reservorio de disolvente (R), una bomba para líquidos (usualmente proveniente de un sistema de cromatografía líquida) (B), una chaqueta de calentamiento (H), una celda de pre-calentamiento (CP), válvula anti-retorno (VA), la celda de extracción (CE), una válvula reguladora de presión (BPR) y un recipiente colector del extracto (CF); estos deben soportar altas presiones (52).

Tanto para SFE como para PLE, el proceso de extracción puede desarrollarse de forma dinámica o de forma estática, dependiendo de la configuración del equipo. En forma dinámica, el disolvente de extracción fluye continuamente por la muestra contenida en la celda de extracción por lo que la relación masa de muestra a flujo de disolvente es menor, ya que requiere un mayor volumen de

disolvente, en comparación con el sistema estático. En modo estático, un volumen determinado de disolvente es puesto en contacto con la muestra por un tiempo dado, lo que permite la saturación del disolvente (52). El proceso de extracción consiste en uno o varios ciclos de extracción, con reemplazo de disolvente entre ciclos. Los factores determinantes en esta última configuración son la temperatura, el tiempo de extracción y el número de ciclos de extracción (32).

Los métodos de extracción exhaustiva (comúnmente aplicados en métodos analíticos) usualmente requieren de más tiempo o grandes cantidades de disolvente, para lograr la remoción total de los componentes de la muestra. Por lo general a escala industrial, se realizan extracciones que permiten obtener la mayor cantidad de analitos, sin lograr remoción “total”, con el propósito de disminuir tiempo de extracción y volúmenes de disolvente, sin arriesgar la rentabilidad del proceso (47).

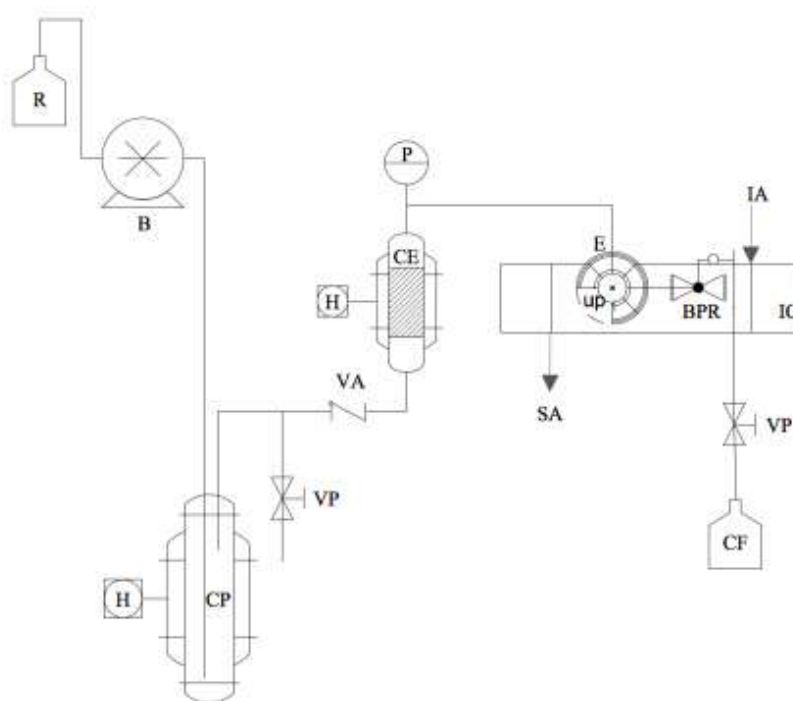


Figura 1-9. Equipo de extracción de líquidos presurizados.

(R: Reservorio para el disolvente, B: Bomba, H: Chaqueta de calentamiento con controlador de temperatura, CP: celda de pre-calentamiento, VA: Válvula anti-retorno, VP: Válvula de paso, CE: Celda de extracción, P: Manómetro, E: espiral (dirección de flujo), BPR: Válvula reguladora de presión, IC: Intercambiador de calor, IA: Ingreso de agua, SA: Salida de agua).

Un paso importante en los tratamientos de extracción es el pretratamiento de la muestra, del cual pueden hacer parte las operaciones de secado, molienda, tamizado y homogenizado. La molienda y tamizado generan un tamaño de partícula en la muestra a extraer, lo cual afecta la transferencia de masa de los analitos, así como el rendimiento de extracción, esto está relacionado con la superficie de contacto (a menos tamaño de partícula, la superficie de contacto soluto-disolvente aumenta). Entre mayor es la superficie de contacto, mejor accesibilidad tendrá el disolvente por los analitos, debido a que, la transferencia del analito a través de los poros aumenta al disminuir el tamaño de partícula; sin embargo, tamaños de partícula muy pequeños puede generar aglomeración de partículas de soluto que pueden ocasionar taponamiento en los equipos de extracción (54). Por otra parte, uno de los parámetros que deben tener en cuenta en el proceso de extracción, es la relación que existe entre la cantidad de muestra y la cantidad de disolvente.

Finalmente, teniendo en cuenta el horizonte que se presentó en el estado actual del tema, el presente trabajo de investigación consideró como objetivo general:

Evaluar desde el punto de vista alimentario dos subproductos del café (cascarilla y película plateada), con el propósito de plantear potenciales aplicaciones para alguno de estos.

Para alcanzar este propósito se formularon tres objetivos específicos, a saber:

- (i) Realizar un estudio de las biomásas de interés, mediante análisis proximal, capacidad antioxidante *in vitro*, contenido total de compuestos fenólicos y contenido de cafeína.
- (ii) Someter la biomasa más promisoría a PLE, comparando el efecto de la composición de la fase extractante y la temperatura de extracción, sobre las características de los extractos obtenidos (rendimientos, capacidad antioxidante *in vitro* y contenido total de compuestos fenólicos).
- (iii) Determinar el número de ciclos de extracción por PLE para agotar la muestra.

Cada uno de los capítulos que viene a continuación corresponde a uno de los objetivos específicos planteados. En cada capítulo se encontrara una breve introducción, una sección de materiales y métodos, otra de resultados y discusión y las respectivas conclusiones.

Referencias

1. Cenicafé. El sector cafetero es motor de la economía y garantía de estabilidad y paz social [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 24]. Available from: https://www.federaciondecafeteros.org/algrano-fnc-es/index.php/comments/el_sector_cafetero_es_motor_de_la_economia_y_garantia_de_estabilidad_y_paz_/
2. Fedecafé. Produccion de cafe de Colombia [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 24]. Available from: https://www.federaciondecafeteros.org/particulares/es/sala_de_prensa/detalle/produccion_de_cafe_de_colombia_cerro_en_136_millones_de_sacos/
3. Fedecafé. Tabla precio interno de referencia [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 24]. Available from: <https://dolar.wilkinsonpc.com.co/descargas/certificado-cafe-2019-11-24.pdf>
4. Janissen B, Huynh T. Chemical composition and value adding applications of coffee industry by products: A review. *Resour Conserv Recycl*. 2018;128:110–7.
5. Heeger A, Kosinska A, Cantergiani E, Andlauer W. Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chem*. 2017;221:969–75.
6. Hino A, Adachi H, ENomoto M, Fukuri K, Shigeoh Y. Habitual coffee but not green tea consumption is inversely associated with metabolic syndrome: An epidemiological study in a general Japanese population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:383–9.
7. Carman AJ, Dacks PA, Lane RF, Al. E. Current evidence for the use of coffee and caffeine to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer’s disease. *J Nutr Health Aging*. 2014;18:383–92.
8. Esquivel P, Jiménez VM. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res Int*. 2012;46:488–95.
9. Sánchez-Camargo AP. Desarrollo de nuevas estrategias de extracción para la obtención de compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. [Internet]. 2017. 16-45 p. Available from: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/679026>
10. Vazquez-Roig P, Picó Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. *Trends Anal Chem*. 2015;71:55–64.
11. Shang Y, Xu J, Lee W, Um B. Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African J Bot*. 2017;109:75–80.
12. Narita Y, Inouye K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res Int J*. 2014;61:16–22.
13. Murthy PS, Naidu MM. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *Resour Conserv Recycl*. 2012;66:45–58.
14. ICO. Total production by all exporting countries [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 12].

Available from: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>

15. Sanchez D, Anzola V. C. Caracterización química de la película plateada del café (*coffea arábica*) en variedades Colombia y Caturra. *Rev Colomb Química*. 2012;41:211–25.
16. Estructura del café [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <http://www.guatemalabuencafe.com/estructura-del-caf-.html>
17. Iriondo-DeHond A, Aparicio N, Fernandez-gomez B, Guisantes-batan E, Velázquez F, Patricia G, et al. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2019;51:194–204.
18. Chanakya HN, De Alwis AAP. Environmental Issues and Management in Primary Coffee Processing. *Process Saf Environ Prot*. 2004;82:291–300.
19. Rodríguez-Valencia N. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. *Cenicafé*. 2014.
20. del Castillo M, Fernandez-Gomez B, Martinez-Saez N, Iriondo-DeHond A, Mesa M. Coffee By-products. In: *Coffee*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2019. p. 309–34.
21. Pérez-Hernandez L, Chàvez-Quiroz K, Medina-Juárez LA, Gámez-Mesa N. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* Y *Coffea canephora*. *Rev Ciencias Biológicas y la Salud*. 2011;15:51–6.
22. Mirón-mérida V, Yáñez-fernández J, Montañez-barragán B, Barragán B. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *LWT - Food Sci Technol*. 2019;101:167–74.
23. Benitez V, Rebollo-Hernanz M, Hernanz S, Chantres S, Aguilera Y, Martin-Cabrejas MA. Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: Functional and physiological characterization. *Food Res Int*. 2019;122:105–13.
24. Bessada S, Alves R, Costa A, Nunes MA, Oliveira MB. *Coffea canephora* silverskin from different geographical origins: A comparative study. *Sci Total Environ*. 2018;645:1021–8.
25. Borrelli Cinzia R, Esposito F, Napolitano A, Ritieni A, Vincenzo F. Characterization of a New Potential Functional Ingredient: *Agric Food Chem*. 2004;52:1338–43.
26. Fernandez-Gomez B, Lezama A, Dolores M. Insights on the health benefits of the bioactive compounds of coffee silverskin extract. *J Funct Foods*. 2016;25:197–207.
27. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Costa E, Costa CSG, Nunes MA, et al. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chem*. 2018;267:28–35.
28. del Castillo M, Iriondo-DeHond A, Martinez-Saez N, Fernandez-Gomez B, Iriondo-DeHond M, Zhou J-R. Applications of recovered compounds in food products. *Handb Coffee Process By-Products*. 2017;171–94.
29. Coelho MS, Fernandes SS, Salas-Mellado M de las M. Association Between Diet, Health, and the Presence of Bioactive Compounds in Foods. *Bioactive Compounds*. 2019. 159-183 p.
30. Cárdenas G, Arrazola G, Villalba M. Frutas Tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos. *Rev la Fac Ing*. 2016;33:29–40.

31. Jarma-Arroyo B, Pinheiro-Santos A, de Almeida de Melo E, Campos A, Lins L, Boyano-Orozco LC. Bioactive Compounds and Their Potential Use as Ingredients for Food and Its Application in Food Packaging. *Bioactive Compounds*. Elsevier Inc.; 2019. 143-156 p.
32. Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;703:8–18.
33. Valdivieso-ramírez CS, Salda MDA. Pressurized fluid systems : Phytochemical production from biomass. *J Supercrit Fluids*. 2015;96:228–44.
34. Plaza M, Turner C. Pressurized Hot Water Extraction of Bioactives. *Compr Anal Chem*. 2017;76:53–82.
35. Drago ME, López M, Sainz T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2006;37:58–68.
36. Gimeno-Creus E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *offarm*. 2004;23:80–4.
37. Castro H, Parada F. Obtención de Antioxidantes a partir de Residuos Frutícolas empleando Extracción con Fluidos Supercríticos-EFS. Tesis Doctoral. [Internet]. Bogota; 2013. 4-59 p. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/57893/1/198032.2013.pdf>
38. Teran R. Diseño de mezclas de compuestos fenolicos en funcion a su eficacia antioxidante en el aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Tesis de Maestria. [Internet]. Lima; 2014 [cited 2019 Jun 15]. 4-25 p. Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2419>
39. Regazzoni L, Saligari F, Marinello C, Rossoni G, Aldini G, Carini M, et al. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *J Funct Foods*. 2016;20:472–85.
40. Herrera F, Castro H. Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*coffea arabica* L.) empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial. Tesis de grado. [Internet]. Bogota; 2016. Available from: <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/10362>
41. Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2011;10:221–47.
42. Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In: *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. España; 2008. p. 129–62.
43. Zhong Y, Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 2015. 285-333 p.
44. Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC 50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem*. 2013;138:414–20.
45. Jimenez N, Arango GJ. Actividad Captadora de Radicales Libres y Citotoxicidad de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae. *Acta Farm Bonaer*. 2005;24:337–42.

46. Riaza AB. Biorrefinería de microalgas: estudio de procesos a partir de *Phaeodactylum tricornutum*. Tesis de maestría [Internet]. Madrid; 2015. 9-17 p. Available from: <http://hdl.handle.net/10261/152094>
47. Palma M, Barbero GF, Rostagno MA, Prado JM, Meireles MA. Extraccion of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. In: Natural Products Extraction Principles and Applications. 2013. p. 58–88.
48. Velasco RJ, Villada HS, Cauca U, Agroindustria D De, Agropecuarias FDC. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Inf Tecnol*. 2007;18:53–65.
49. Pasquel A, Castillo A, Linares D. Montaje de un extractos de fluidos presurizados. *Rev Amaz Investig Aliment*. 2001;14:9–14.
50. Castillo H. Extracción con Fluidos Supercríticos. Los Compuestos Bioactivos y Tecnol Extracción. 2016;108–18.
51. Santos D., Gomes M, Vardanega R, Rostagno M, Meireles MA. Integration of Pressurized Fluid-based Technologies for Natural Product Processing. In: Natural Products Extraction Principles and Applications. 2013. p. 399–441.
52. Ballesteros-Vivas D. Estudio comparativo sobre la obtención de extractos con actividad citotóxica a partir de residuos frutícolas. Tesis de maestría. [Internet]. Bogota; 2015. 25-33 p. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/52021/>
53. Ballesteros-Vivas D, Ortega-Barbosa JP, Sánchez-Camargo A del P, Rodríguez-Varela LI, Parada-Alfonso F. Pressurized Liquid Extraction of Bioactives. In: Reference Module in Food Science. Bogota; 2020. p. 1–15.
54. Alvarez-Rivera G, Bueno M, Mendiola JA, Ibanez E. Pressurized Liquid Extraction. In: Liquid Phase Extraction [Internet]. Madrid; 2020. p. 375–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012816911700013X?via%3Dihub>

2. Caracterización química y proximal de dos biomasas de café: estudio comparativo

El presente capítulo presenta los resultados del análisis proximal por medio de técnicas AOAC, de dos subproductos de café (cascailla-CC y película plateada-PP), así como la extracción y caracterización de extractos obtenidos por medio de una técnica convencional de extracción (sólido-líquido); en estos se evaluó, el contenido total de fenoles (CTF) y capacidad antioxidante *in vitro* mediante el ensayo TEAC. Por otra parte, se obtuvieron extractos con agua en ebullición, en los cuales se realizó la determinación de cafeína y ácido clorogénico. Contrastando la información obtenida, fue posible determinar cuál de los dos subproductos estudiados presenta un mejor perfil nutricional. Como resultado de lo anterior se estableció que la película plateada de café-PP es el subproducto con mejor perfil nutricional, mayor CTF, mejor capacidad antioxidante *in vitro* y mayor contenido de cafeína. Por tal razón, la PP fue la biomasa con la que se llevó a cabo el estudio en los capítulos tres y cuatro.

2.1 Introducción

Los subproductos agroindustriales se han convertido en un tema de interés en los últimos años, el aprovechamiento de éstos ha generado diversas investigaciones para lograr una utilización de los mismos (1,2). El café es un producto de gran interés que, genera una gran cantidad de subproductos, causando efectos ambientales, debido a que estos subproductos son desechados sin un tratamiento previo, generando contaminación del suelo y del agua. Esto debido a su considerable contenido de compuestos fenólicos, cafeína, taninos, ácido clorogénico, entre otros (3). La producción de café en Colombia para el año 2018, fue de 13.6 millones de sacos (4). Dos de los subproductos que se pueden encontrar en el proceso de beneficio del café son la CC y la PP en los cuales se basa esta parte de esta investigación. La CC corresponde a cerca de un 5,8 % en peso del café verde y la PP corresponde aproximadamente 16% en peso del café tostado. A su vez, la PP corresponde a 4,2% de peso seco de la baya de café, lo cual hace que estas biomasas sean de interés y constituyan un recurso promisorio para ser estudiadas y aprovechadas (1,5).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material Vegetal

Los subproductos de café fueron proporcionados por la empresa La Tostadora S.A.S. (la cual maneja la marca Café de la Fonda). La CC se obtuvo del proceso de tilla del café pergamino, mientras que la PP se obtuvo del proceso de tostado de café.

Cada subproducto fue molido con un molino de cuchillas de capacidad de 350 ml (KitchenAID, USA). Posteriormente, la muestra se tamizó (empleando tamices estándar de la serie Tyler), seleccionando para este estudio la fracción retenida en la Malla # 50 (300 μm), debido a que es el tamaño más adecuado para ser implementado en las pruebas y extracciones posteriores. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en oscuridad y a temperatura ambiente (18 °C, aprox.).

2.2.2 Determinación de la composición química

El análisis proximal se llevó a cabo por medio de metodologías oficiales de la norma AOAC (6,7), por triplicado para cada tratamiento, analizando:

- Humedad: secado en mufla o estufa hasta peso constante – AOAC N° 931.04.
- Fibra dietaria total: – AOAC N° 985.29 (1998).
- Proteína bruta: método de Kjeldahl – AOAC N° 920.152.
- Grasa bruta: extracción por método de Soxhlet – AOAC N° 31.4.02.
- Cenizas: incineración a 550° - 600° C – AOAC N° 940.26.

Esta determinación se lleva a cabo para seleccionar la biomasa con mejor perfil nutricional.

2.2.3 Extracción sólido-líquido convencional

Las dos biomásas (0,50 g), por separado y por triplicado, fueron sometidas a extracción sólido-líquido en una mezcla de 20 ml metanol (MeOH):agua (H₂O) (50:50) acidificada al 8% con ácido clorhídrico (HCl) 2 N, se agitó por una hora, luego se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm 4 °C y se guardó cada uno de los sobrenadantes. Cada uno de los residuos se sometió a extracción nuevamente con 20 ml de acetona:H₂O (80:20 % v/v) por 1 hora, se centrifugó a 3500 rpm, 20 °C por 15 min. Se reunieron los dos sobrenadantes de cada biomasa. Por separado, cada par de sobrenadantes reunidos, se rotaevaporó a sequedad (Büchi, Alemania) y se determinó en cada uno de éstos el rendimiento de

extracción, el CTF y la capacidad antioxidante *in vitro* cada uno de los análisis fueron llevados a cabo por triplicado.

2.2.4 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos (CTF)

La determinación del CTF fue realizada por el método espectrofotométrico empleando la metodología de Folin-Ciocalteu (8,9), con algunas modificaciones. En un tubo eppendorf se adicionaron 600 μ L de agua destilada, 10 μ L del extracto (Previamente diluido en el solvente empleado para la extracción, a una concentración apropiada) y 10 μ L del reactivo de Folin, se agitó en un vortex y se dejó reposar por 1 min. Posteriormente se agregaron 150 μ L de carbonato sódico al 20% y finalmente 190 μ L de agua destilada, se dejó a temperatura ambiente y oscuridad por 2 h. Luego se dispensó 300 μ L en una placa multipozo por triplicado y se midió la absorbancia en un lector de placas (Sky Multiskan, ThermoFisher) a 760 nm. Los resultados fueron comparados con una curva de calibración de ácido gálico (0,031-1,000 mg/ml) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (AGE) por g de extracto y mg de AGE/100 g de muestra.

2.2.5 Capacidad antioxidante *in vitro* por método TEAC

El compuesto cromógeno ABTS de color azul al reaccionar con persulfato de potasio genera el ion-radical $ABTS^+$ de color azul verdoso que posteriormente, en presencia de un antioxidante se decolora (10).

Para este método, basado en Re et al (1999), se preparó una solución de ABTS 7,0 mM y persulfato de potasio 139,8 mM en agua, se mezcló y se dejó en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente. El radical preparado se diluyó en buffer PBS (dihidrogenofosfato de potasio y de sodio anhidro) hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Para cada extracto de PLE se prepararon 5 concentraciones con el fin de ajustar el porcentaje de inhibición entre 20 y 80%. La curva de calibración se preparó con patrón de Trolox (0,25 - 2,00 mM). Para la reacción, se adicionó en un eppendorf 10 μ L de estas concentraciones de Trolox o del extracto a ensayar y 1000 μ L de ion-radical ABTS diluido (0,7 de absorbancia), y se agitó en vortex. Luego 300 μ L de cada tubo se dispensaron en cada pozo de la placa multipozo (Sky Multiskan, ThermoFisher) y se leyó durante 45 min a 734 nm (11). Los resultados se expresaron como mmol de Trolox equivalente (TE)/g de extracto, mg de TE/g de extracto y mg de TE/100 g de muestra.

2.2.6 Extracción y cuantificación de cafeína y ácido clorogénico

Para la extracción de cafeína y ácido clorogénico se empleó, 15,000 g de cada biomasa, cada una de las cuales se sometió a extracción convencional con 400 ml de H₂O en ebullición por un tiempo de 15 min. Posteriormente en cada extracto obtenido se determinó el contenido de cafeína y de ácido clorogénico. Cada extracto se analizó mediante el sistema Dionex UltiMate 3000 RS Pump UHPLC (Thermo scientific), utilizando una columna Hypersil GOLD (150 mm - 2.1 mm, 1,9 µm, tamaño de poro de 175 Å). La elución se realizó con un gradiente de agua acidificada con ácido fórmico al 1% (eluyente A), H₂O:acetonitrilo (99:1) (eluyente B), acetonitrilo - ácido fórmico al 15% (eluyente C); durante todo el análisis se mantuvo una fase móvil con 20% de C. La separación comenzó con 80% de A, durante 2 min, 2–20 min B aumentó a 20% y A disminuyó a 60%, de 20–24 min, B aumento al 80% manteniendo esta composición, durante 4 min. A partir de los 28 minutos, A se restableció al 80%, A y C se mantuvieron 80-20% por 7 minutos. El tiempo total del análisis fue de 35 min a un flujo de fase móvil de 0,4 ml/min. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos a 260, 280, 320 y 340 nm. Se realizó curvas de calibración de cafeína (0-100 ppm) y una curva de ácido clorogénico de (0-100 ppm), usando para ellos estándares grado cromatográfico, los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.7 Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado, para el análisis proximal los datos se expresaron en base seca, para la extracción convencional su rendimiento se expresó como porcentajes en masa, los CTF y la capacidad antioxidante *in vitro* fueron reportados como se especifica en cada uno de los análisis.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Determinación de la composición química

Los resultados obtenidos para el análisis proximal de los subproductos de café se muestran en la **Tabla 2.1**.

De acuerdo a lo encontrado durante esta investigación, la CC contiene 7,96% de humedad y 0,75% de cenizas, siendo estos valores inferiores a los obtenidos por Gómez y col. (10,1% y 1,2%) y Rocha y

col. (13,1% y 3,7%) (12,13). El contenido de proteína también presentó valores menores (1,5%) comparado con lo reportado por otros autores 3,1% (1). Para esta biomasa se obtuvo un contenido de fibra total de 82,0 %, un valor más bajo al reportado (92,69%) por otros autores como Iriando y col. (2018)(1). Por su parte, otros autores reportan que la CC está compuesta por α -celulosa (40-49%), hemicelulosa (25-32%), lignina (33-35%) y ceniza (0,5-1%) (1).

Tabla 2-1. Análisis proximal de cascarilla y película plateada de café.

Componente	Cascarilla de café – CC	Película plateada – PP
Humedad (%)	7,96 \pm 0,09	5,21 \pm 0,49
*Cenizas (%)	0,75 \pm 0,01	5,24 \pm 0,14
*Grasa (%)	1,73 \pm 0,23	5,43 \pm 0,01
*Proteína (%)	1,51 \pm 0,22	13,10 \pm 0,44
*Fibra dietaria (%)	81,90 \pm 0,15	73,81 \pm 0,41
*Fibra insoluble (%)	79,91 \pm 0,61	61,22 \pm 1,02
*Fibra soluble (%)	2,03 \pm 0,13	12,61 \pm 0,64

*Valores reportados en base seca

La PP, al ser un subproducto del tostado del grano, presenta menor humedad (5,21%) y mayor contenido de proteína (13,10%), grasa (5,43 %) y cenizas (5,24%), con respecto a la CC.

Trabajos previos en PP determinaron un porcentaje de grasa inferior (1,56 a 3,28%) (1); al determinado en el presente trabajo (5,4%). Por otra parte, Jiménez-Zamora y col. reportaron un contenido de cenizas de 5,4% (14). Así mismo, el porcentaje de proteína bruta fue similar a los reportados en los trabajos mencionados (1,14) y ligeramente mayor a los encontrados por Sánchez y col. (11,82%-11,91%) (10).

Vale la pena tener en cuenta que al cuantificar nitrógeno total por Kjeldahl, el valor se ve afectado por la presencia de compuestos nitrogenados no proteicos como los desarrollados en la reacción de Maillard durante el proceso de tostado del café (5,10,14), los cuales dependiendo el grado y tiempo del proceso de tostado tendrán una capacidad antioxidante importante.

Por último, se destaca el contenido de fibra dietaria total (73,8%) en la PP, dividida en fibra dietaria insoluble y soluble, llegando esta última al 12,61%. Algunos autores reportan valores de fibra dietaria total de 67,6 y 62,4% para este subproducto (1,15).

Al realizar una comparación entre los dos subproductos estudiados, se encuentra que la PP presentó un mejor perfil nutricional, debido a los contenidos de grasa, cenizas y fibra dietaria soluble; la importancia del perfil nutricional en esta investigación se fundamenta, en la selección de la mejor biomasa, la cual se empleara en la producción de alimento con características funcionales.

2.3.2 CTF y capacidad antioxidante *in vitro* de CC y PP

Los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción convencional fueron para la CC 3,09% y para la PP 10,32%, ver la **Tabla 2.2**. Algunos autores han obtenido rendimientos cercanos o superiores por medio de técnicas similares, por ejemplo Regazzonico et al (2016); al extraer con una mezcla EtOH:H₂O obtuvieron un rendimiento de 13% para PP (16), mientras que Narita et al. (2014), lograron rendimientos de 16 y 19% para PP, al extraer con agua a 25 y 80 °C respectivamente. Para CC los estudios son pocos, y en éstos no se ha reportado el rendimiento de extracción.

Tabla 2-2. Caracterización de los extractos convencionales de CC y PP

	Rendimiento %	mg de AGE / g de extracto	mg de AGE/ 100 g de muestra	mg de TE/ g de extracto	mg TE/100 g de muestra
CC	3,09 ± 0,52	15,97 ± 0,32	49,34 ± 0,99	53,75 ± 0,01	166,08 ± 0,03
PP	10,32 ± 0,70	34,53 ± 2,00	356,34 ± 20,00	128,75 ± 0,01	1328,70 ± 0,10

AGE: equivalentes de ácido gálico, TE: Equivalentes de Trolox.

Respecto al contenido de fenoles totales, la CC presentó un valor de 15,97 mg de AGE/g de extracto, y para PP se obtuvo 34,53 mg de AGE/g de extracto. Por su parte la capacidad antioxidante *in vitro* fue de 1328,70 mg de TE/100 g de muestra y 166,08 mg de TE /100 g de muestra para PP y CC, respectivamente, siendo notable la diferencia entre estas dos biomásas.

En CC se reportó un CTF entre 102,60 y 647,50 mg de AGE/g de muestra y una capacidad antioxidante entre 2,43 y 3,28 g de TE/100 g de muestra (17). Por otra parte para la PP se encontraron valores en la literatura inferiores a los obtenidos en el presente estudio, con un CTF de 11,50 mg AGE/100 g de muestra (18) y una capacidad antioxidante de 1,09 g de TE/100 g de muestra (10), demostrando así la superioridad de los resultados obtenidos en la PP estudiada en este trabajo, lo cual

puede atribuirse a que la PP estudiada en esta investigación es tostada, mientras que la reportada en literatura es sin tostar, además la procedencia del grano puede generar distintas características..

2.3.3 Determinación de CGA y de cafeína

Para la determinación de ácido clorogénico (CGA) y de cafeína los tiempo de retención promedio fueron 10,23 y de 11,24 min, respectivamente, según los datos obtenidos de las curvas de calibración. Las áreas y los tiempos de retención obtenidos para los analitos, tanto en CC como en PP, se encuentran en la **Tabla 2-3**. En la **Figura 2-1**, se observa la similitud entre los perfiles cromatográficos obtenidos.

Tabla 2-3. Contenido de CGA y de cafeína en CC y PP.

Muestra	Área	tr (min)	ppm
CC CGA	12,06	10,96	26,33 ± 0,41
CC Cafeína	11,80	10,28	43,56 ± 1,96
PP CGA	21,75	10,86	24,56 ± 0,36
PP Cafeína	10,97	10,29	78,28 ± 1,67

Los valores obtenidos muestran contenidos similares de CGA en los dos extractos (cercano a 25 ppm) y mayor contenido de cafeína en el extracto de PP. Dichos resultados son superiores a los reportados para infusión de PP, donde obtuvieron 20 ppm de CGA y 50 ppm de cafeína, pero inferiores a los reportados para el grano de café, 150 ppm de CGA y 174 ppm de cafeína (3).

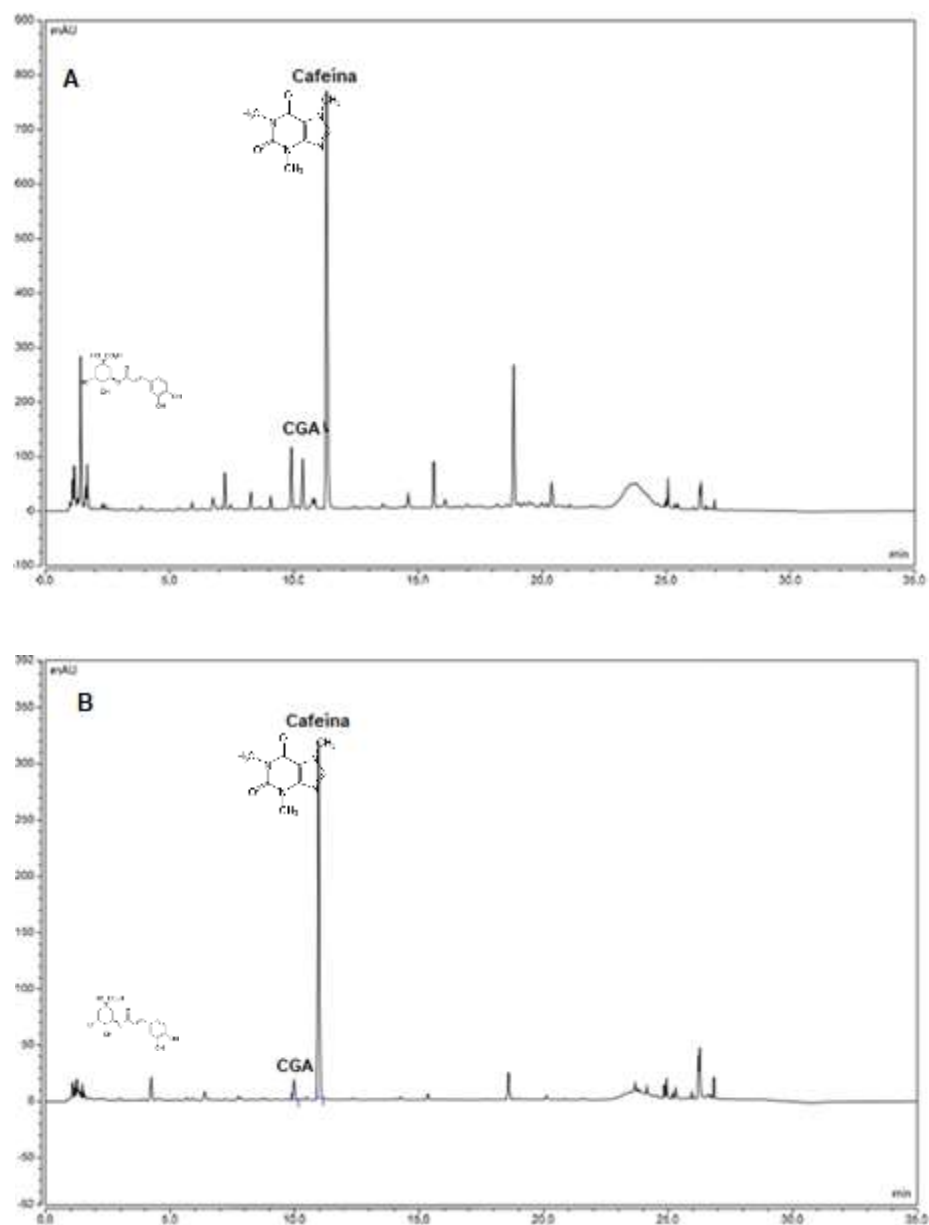


Figura 2-1. Perfil cromatográfico a 280 nm de A) CC y B) PP.

Varios autores afirman que el CGA presenta propiedades antioxidante, antitumoral y antihipertensivo, entre otros (5,19). En cuanto a la cafeína, algunos autores afirman que su consumo tiene como beneficio la disminución del riesgo de padecer obesidad y diabetes, la reducción en los síntomas del Parkinson y el retraso en el deterioro cognitivo dado por enfermedades como Alzheimer (20–22).

2.4 Conclusiones

A continuación se mencionan las conclusiones más relevantes que se derivan de este capítulo.

- Al evaluar la composición química de los dos subproductos del café, mediante el análisis proximal, se encontró que la película plateada (PP) muestra un mejor perfil nutricional; ya que por los contenidos de proteína (13,1%), grasa (5,4%), fibra dietaria (73,8%) y fibra insoluble (12,6%) se puede afirmar que esta biomasa puede ser aprovechable y valorizada.
- Respecto al contenido total de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante *in vitro* la película plateada se destacó por sus valores (356,34 mg AGE/g de muestra y 1328,70 mg de TE/100 g de muestra), los cuales son superiores a los reportados por otros autores.
- La PP presentó un mayor contenido de cafeína (78,28 ppm) respecto a la CC, y las dos biomásas presentaron un contenido similar de ácido clorogénico.
- Teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos en el presente capítulo, se determinó que la PP es el subproducto más promisorio.

Referencias

1. Iriondo-DeHond A, Aparicio N, Fernandez-gomez B, Guisantes-batan E, Velázquez F, Patricia G, et al. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2019;51:194–204.
2. Mirón-mérida V, Yáñez-fernández J, Montañez-barragán B, Barragán B. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *LWT - Food Sci Technol*. 2019;101:167–74.
3. Heeger A, Kosinska A, Cantergiani E, Andlauer W. Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chem*. 2017;221:969–75.
4. Federación Nacional de Cafeteros. Produccion de café [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 23]. Available from: https://www.federaciondecafeteros.org/particulares/es/sala_de_prensa/detalle/produccion_de_cafe_de_colombia_cerro_en_136_millones_de_sacos/#targetText=Bogotá%2C enero 4 de 2019,inferior al cierre de 2017.&targetText=En diciembre de 2018 la,del mismo mes d
5. Bessada S, Alves R, Costa A, Nunes MA, Oliveira MB. *Coffea canephora* silverskin from different geographical origins: A comparative study. *Sci Total Environ*. 2018;645:1021–8.
6. A.O.A.C. AOAC: Official Methods of Analysis. 17th ed. Vol. Volume I y, Association of Official Analytical Chemist. 2000.
7. A.O.A.C. AOAC: Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist. 1998.
8. Kosar M, Dormana HJD, Hiltunena R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem*. 2005;91:525–33.
9. Singletn VL, Orthofer R, Lamuela R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152–78.
10. Sanchez D, Anzola V. C. Caracterización química de la película plateada del café (*coffea arábica*) en variedades Colombia y Caturra. *Rev Colomb Química*. 2012;41:211–25.
11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231–7.
12. Gómez A, Rincón SL, Wiest W. Transformación termoquímica de la biomasa residual del proceso de extracción del aceite de palma : tecnologías y perspectivas Thermochemical Transformation of the Residual Biomass from the Palm Oil Extraction Process : Technologies and Prospects. *Palmas*. 2004;25:388–97.
13. Rocha D, Filippetto D, Fonseca F, P JMM, Luengo CA, Pippo WA. Biomass briquetting and its perspectives in Brazil. *Biomass and Bioenergy*. 2011;5:1–7.

14. Jiménez Zamora A, Pastoriza S, José RH. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT – Food Sci Technol*. 2015;61:12–8.
15. Borrelli Cinzia R, Esposito F, Napolitano A, Ritieni A, Vincenzo F. Characterization of a New Potential Functional Ingredient: *Agric Food Chem*. 2004;52:1338–43.
16. Regazzoni L, Saligari F, Marinello C, Rossoni G, Aldini G, Carini M, et al. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *J Funct Foods*. 2016;20:472–85.
17. Fonseca-García L, Calderon-Jaime L, María R. Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en Norte de Santander (Colombia). *Rev la Fac química Farm*. 2014;21:228–36.
18. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Costa E, Costa CSG, Nunes MA, et al. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chem*. 2018;267:28–35.
19. Suzuki A, Kagawa D, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Rev Hipertens*. 2002;25:99–107.
20. Hino A, Adachi H, ENomoto M, Fukuri K, Shigeoh Y. Habitual coffee but not green tea consumption is inversely associated with metabolic syndrome: An epidemiological study in a general Japanese population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:383–9.
21. Carman AJ, Dacks PA, Lane RF, Al. E. Current evidence for the use of coffee and caffeine to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*. 2014;18:383–92.
22. Janissen B, Huynh T. Chemical composition and value adding applications of coffee industry by products: A review. *Resour Conserv Recycl*. 2018;128:110–7.

3. Obtención de extractos de la película plateada de café con potencial bioactivo, por medio de extracción con líquidos presurizados

En este capítulo se muestra el potencial bioactivo que poseen los extractos obtenidos a partir de la película plateada de café-PP, empleando una técnica de extracción verde, como es la extracción con líquidos presurizados-PLE. En el PLE se estudió el efecto de la temperatura (50, 100 y 150 °C), y de la composición del disolvente (0, 50, y 100% EtOH:H₂O), sobre el rendimiento de extracción, CTF, el contenido total de Flavonoides-CTFI, y la capacidad antioxidante *in vitro* (por los métodos TEAC y EC₅₀). Entre las condiciones evaluadas, la temperatura fue la más influyente. En la optimización de las variables respuesta se determinó como condiciones óptimas de extracción 150 °C y 100% EtOH, logrando un rendimiento de extracción de 18,20%, CTF de 109,34 mg ácido gálico equivalente/g extracto (1989,98 mg AGE/100 g muestra), CTFI de 15,51 µg quercetina equivalente/g extracto (0,28 mg QE/100 g muestra), y una capacidad antioxidante de 1,11 mmol de TE/g extracto (245,50 mg TE/g extracto ó 4504,50 mg TE/100 g muestra ó 247,5 mg TE/g de extracto) y un EC₅₀ de 26,74 µg/ml.

3.1 Introducción

La extracción con líquidos presurizados, PLE es una técnica emergente de extracción que emplea cantidades moderadas de disolventes y tiempo de extracción cortos. Ésta emplea disolventes a elevadas presiones y temperaturas los cuales deben estar por debajo del punto crítico, así los disolventes se mantienen líquidos, esto genera una modificación de sus propiedades fisicoquímicas (1,2). Mediante PLE se logra obtener altos rendimientos de extracción, ya que la transferencia de masa aumenta, la tensión superficial y viscosidad del disolvente disminuyen, permitiendo una mejor penetración del disolvente en la muestra y una mayor solubilidad de los analitos. Dependiendo del tipo de compuestos que se desee extraer se elige el disolvente, por lo que se debe tener en cuenta la naturaleza y características de los analitos objetivo. En los últimos años ha aumentado el empleo de PLE en la obtención de extractos bioactivos, esto incrementa el interés de implementar este tipo de

extracción, en la búsqueda de subproductos candidatos a ser aprovechados en la industria de alimentos y farmacéutica (3).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material Vegetal

Se empleó la PP descrita en el ítem 2.2.1, así como el procedimiento para preparar la misma.

3.2.2 Obtención de extractos empleando líquidos presurizados (PLE)

El equipo PLE estaba conformado por una celda de precalentamiento (185 ml de capacidad) y otra de extracción (83 ml), construidas en acero inoxidable 316S, cada una cubierta por una camisa de calentamiento eléctrica controlada por un panel Watlow SD. La presión al interior de la celda fue regulada por una válvula Amflow BP-6. La válvula estaba inmersa en un intercambiador de calor que usaba agua como fluido de enfriamiento, lo cual permitía recuperar el extracto a temperatura ambiente.

Para abastecer el disolvente se empleó una bomba Beckman-Altex 110A con control de flujo (0,1 a 9,9 ml/min). La tubería, válvulas y racores eran de acero inoxidable y permitían condiciones de operación de hasta 20,0 MPa y 180 °C. El equipo se encuentra en el Laboratorio de Fluidos Presurizados del Grupo de Investigación de Química de Alimentos (GiQA) de la Universidad Nacional de Colombia. En la **Figura 1-9** se esquematiza el equipo empleado, y las características del equipo se describieron en el ítem 1.5.

Para llevar a cabo las extracciones se desarrolló un diseño experimental factorial 3^2 (incluyendo 3 puntos centrales), para un total de 13 experimentos (ver **Tabla 3-1**), donde se estudió el efecto de la temperatura (50, 100 y 150 °C) y de la composición de la fase extractante (0, 50 y 100% EtOH:H₂O). Como parámetros de extracción se tuvieron una presión de 10,0 MPa, tiempo de extracción 20 min y una cantidad de muestra de 1,4 g, el volumen de la celda de extracción fue de 15 ml, la cual se llenaba con la fase extractante; por otro lado se empleó una cantidad adicional de disolvente para presurizar el equipo de extracción (85 ml a 50 °C, 135 ml a 100 °C y 185 ml a 150 °C).

Las extracciones se llevaron a cabo en modo estático, esto es, que una vez presurizado el extractor con la fase extractante, no hubo flujo de la misma, hasta después de los 20 min de extracción. Luego el disolvente del extracto fue eliminado por medio de rotaevaporación.

Tabla 3-1. Condiciones de extracción dadas por el diseño experimental.

BLOQUE	Temperatura de extracción (°C)	Composición de la fase extractante (% EtOH)
1	150	50
2	100	50
3	100	50
4	100	100
5	100	0
6	150	0
7	100	50
8	100	50
9	50	50
10	50	0
11	50	100
12	150	100
13	100	50

3.2.3 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos (CTF)

La determinación del CTF fue realizada de acuerdo a la metodología descrita en el ítem 2.2.4 (4,5).

3.2.4 Cuantificación del contenido total de flavonoides (CTFI).

Para determinar el contenido total de flavonoides CTFI, se usó el método de cloruro de aluminio (III), según el procedimiento desarrollado por Hosu et al (2014). Este método identifica solo flavonas y flavonoles. Se tomó 100 µL de los extractos de concentración conocida, se agregó 300 µL de EtOH al 95%, 50 µL de cloruro de aluminio al 10%, 50 µL de acetato de sodio y finalmente 500 µL de agua destilada. La reacción se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se dispensó 300 µL a una placa multipozo y se midió la absorbancia a 415nm, comparando con la curva de calibración hecha con quercetina como estándar (20 -100 µg/ml) (6).

3.2.5 Determinación de capacidad antioxidante *in vitro*

Para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* se empleó dos métodos colorimétricos.

- **Método TEAC:**

Éste se realizó de acuerdo con la metodología descrita en el ítem 2.2.5 (7).

- **Método EC₅₀:**

El compuesto DPPH se caracteriza por tener un electrón desapareado, el cual es un radical libre estabilizado por resonancia; esta deslocalización le otorga una coloración violeta. Cuando el DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrogeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H, con la consecuente degradación del radical DPPH^{•+} por presencia de antioxidantes.

Para este método se preparó una curva de calibración del radical DPPH de 5 concentraciones diferentes disueltas en metanol ($0,75 \times 10^{-5}$ - 9×10^{-5} M). Directamente en la placa múltiplozo se colocaron 10 µl de la muestra o el blanco, posteriormente se agregó 290 µl de DPPH. Se midió la absorbancia a 516 nm; luego de dejar la placa, a temperatura ambiente y en oscuridad por 4 h, se midió nuevamente la absorbancia a 516 nm (8). Los valores fueron expresados en términos de EC₅₀ (µg/ml).

3.2.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los rendimientos se expresaron como el porcentaje en masa (%w/w). Los CTF, CTFI y la capacidad antioxidante por TEAC y EC₅₀, se realizaron por triplicado. El análisis de las diferencias estadísticas de los datos obtenidos se realizó a través de un ANOVA con $p < 0,05$, empleando el software STATGRAPHICS® (2018). Así mismo, los datos se ajustaron a un modelo estadístico con el fin de identificar las condiciones óptimas de extracción. Cada variable respuesta estudiada se ajustó a un modelo cuadrático del tipo:

$$Y = X_0 + X_1A + X_2B + X_{1,1}A^2 + X_{1,2}AB + X_{2,2}B^2 \quad \text{Eq (3.1)}$$

Donde A es temperatura, B composición del solvente (porcentaje de etanol), X₀ es la intercepción, X₁ y X₂ son líneas coeficientes, X_{1,1}, X_{2,2} son coeficientes cuadráticos, X_{1,2} es el coeficiente de interacción de componentes lineales.

3.3 Resultados y discusión

En la **Tabla 3-3** son presentados los resultados del estudio de los factores de extracción involucrados en la obtención de extractos activos de película plateada de café usando PLE. Con el objeto de optimizar las variables de extracción se decidió introducir en el programa estadístico Statgraphics®, los datos obtenidos, en el cual se colocaron como factores el % EtOH y la temperatura (°C), y como variables de respuesta el rendimiento, CTF, CTFI, la capacidad antioxidante por TEAC y por EC₅₀. Obteniendo así un análisis estadístico que definió una ecuación polinomial para cada variable de respuesta, ver **Tabla 3-2**. Se observa que las variables no se encuentran relacionadas entre sí, igualmente el modelo estadístico seleccionado, no es adecuado para describir los datos obtenidos en las variables de rendimiento y de capacidad antioxidante por EC₅₀. (En el **Anexo B-1-5** se reportan las ecuaciones que ajustan los datos al modelo cuadrático, los coeficientes de regresión y significancia). Esto debido a que los valores P fueron menores de 0,05, razón por la cual, no se mostraron las superficies de respuesta para estas dos variables.

Tabla 3-2. Variables de extracción y su respectivo modelo cuadrático.

Variable	Modelo cuadrático	R ²	Valor-P
<i>Rendimiento %</i>	$1,930 - 0,025*A + 0,259*B + 1,463 \times 10^{-3}*A^2 - 1,261 \times 10^{-3}*A*B - 1,758 \times 10^{-3}*B^2$	0,916	0,001
<i>CTF (mg AGE/g extracto)</i>	$17,762 + 0,863*A + 0,066*B - 2,363 \times 10^{-3}*A^2 - 2,310 \times 10^{-4}*A*B + 1,382 \times 10^{-3}*B^2$	0,905	0,148
<i>CTFI (µg QE/g Extracto)</i>	$7,107 + 0,053*A + 0,078*B - 3,002 \times 10^{-4}*A^2 + 1,390 \times 10^{-4}*A*B - 2,606 \times 10^{-4}*B^2$	0,544	0,073
<i>Ec₅₀ µg/ml</i>	$78,558 + 0,219*A - 1,442*B - 3,355 \times 10^{-3}*A^2 + 5,733 \times 10^{-3}*A*B + 4,906 \times 10^{-3}*B^2$	0,887	0,041
<i>TEAC (mmol TE/g extracto)</i>	$0,496 - 0,011*A + 5,307 \times 10^{-3}*B + 1,008 \times 10^{-4}*A^2 - 3,370 \times 10^{-5}*A*B - 7,503 \times 10^{-6}*B^2$	0,933	0,798

A: Temperatura; B: % de EtOH; CTF: Contenido total de fenoles; CTFI: contenido total de flavonoides; QE: Quercetina equivalente; TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de Trolox; EC₅₀: Concentración media máxima que inhibe el 50% del radical DPPH.

A continuación, se hará un análisis detallado de cada una de las variables de respuesta obtenidas.

3.3.1 Rendimiento de extracción

El valor de rendimiento obtenido para los extractos PLE se muestra en la **Tabla 3-3**. En ésta se observa en primera medida una variación en los rendimientos de extracción los cuales aumentan

considerablemente (5,65-16,35-35,39%) al aumentar la temperatura (50-100-150 °C) y conservar la misma relación de disolvente (50% EtOH:H₂O). Más detalles se especifican en el **Apéndice B-6**.

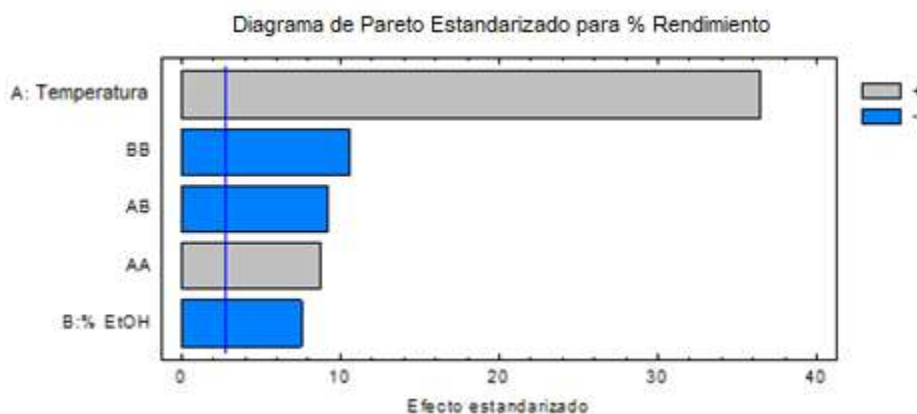


Figura 3-1. Diagrama de Pareto Estandarizado para Rendimiento

Como se muestra en el diagrama de Pareto estandarizado (**Figura 3-1**) la temperatura de extracción fue el parámetro más importante en el uso de PLE, para la variable de respuesta % de rendimiento. La temperatura favoreció la transferencia de masa, ya que, las propiedades fisicoquímicas de los disolventes son modificadas, disminuyendo sus valores de constante dieléctrica y variando su polaridad, esto debido al incremento de este parámetro de extracción. Esto genera que la transferencia de masa sea mayor favoreciendo el rendimiento de extracción. (1).

Esta relación entre la temperatura y el rendimiento se ve reflejada en lo reportado por otros autores como Narita et al, (2012) quienes empleando extracción con agua subcrítica a distintas temperaturas, lograron rendimientos entre 16 a 23%, a medida que aumentaba la temperatura de 25 a 270 °C (9).

Tabla 3-3. Rendimiento, CTF, CTFI y capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos PLE obtenidos de la PP.

Ensayo	Temperatura (°C)	Etanol (%v/v)	Rendimiento (%)	CTF (mg AGE/g extracto)	CTFI (µg QE/g extracto)	TEAC. (mmol TE/g extracto)	EC ₅₀ µg/ml
1	150 (1)	50 (0)	35,39 ± 1,15	96,82 ± 2,93	14,33 ± 0,32	1,11 ± 0,08	29,41 ± 1,16
2	100 (0)	50 (0)	16,98 ± 0,74	82,59 ± 4,40	12,20 ± 0,59	0,32 ± 0,01	35,05 ± 1,16
3	100 (0)	50 (0)	15,12 ± 0,54	85,00 ± 1,24	13,57 ± 0,81	0,53 ± 0,02	39,58 ± 1,15
4	100 (0)	100 (1)	9,74 ± 0,74	106,87 ± 3,86	13,28 ± 0,33	0,46 ± 0,03	21,89 ± 1,02
5	100 (0)	0 (-1)	15,20 ± 0,41	77,02 ± 0,71	9,29 ± 0,74	0,43 ± 0,02	73,41 ± 1,88
6	150 (1)	0 (-1)	28,17 ± 0,94	98,15 ± 1,27	6,85 ± 0,33	0,99 ± 0,04	28,92 ± 3,10
7	100 (0)	50 (0)	15,79 ± 1,60	84,76 ± 4,56	13,37 ± 0,13	0,42 ± 0,04	35,68 ± 1,41
8	100 (0)	50 (0)	16,35 ± 0,41	92,75 ± 4,21	16,88 ± 0,95	0,57 ± 0,04	37,59 ± 0,50
9	50 (-1)	50 (0)	5,65 ± 0,28	68,34 ± 3,27	8,04 ± 0,30	0,31 ± 0,01	24,58 ± 1,10
10	50 (-1)	0 (-1)	6,74 ± 0,38	54,38 ± 4,10	10,66 ± 0,82	0,16 ± 0,01	83,39 ± 8,47
11	50 (-1)	100 (1)	8,72 ± 0,15	67,88 ± 2,31	17,92 ± 1,00	0,50 ± 0,02	24,11 ± 1,00
12	150 (1)	100 (1)	18,20 ± 0,94	109,34 ± 4,66	15,50 ± 0,65	0,99 ± 0,07	26,74 ± 1,03
13	100 (0)	50 (0)	16,19 ± 2,03	80,55 ± 2,03	13,91 ± 0,29	0,31 ± 0,02	35,42 ± 1,06

Valores codificados entre paréntesis. CTF: contenido total de fenoles; CTFI: contenido total de flavonoides. Los valores fueron promediados de un triplicado AGE: equivalentes ácido gálico; QE: Quercetina equivalente; TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de Trolox; EC₅₀: Concentración media máxima que inhibe el 50% del radical DPPH.

Estudios similares se han llevado a cabo con otras biomásas del café, donde al realizar extracción PLE sobre la cascarilla de café, se observa un aumento de rendimiento de 0,72 a 1,38%, al aumentar la temperatura de 45 a 75°C (10). También se realizó sobre granos de café donde se logró rendimientos de (6,97 a 9,78%) al aumentar la temperatura de extracción de 50 a 70 °C (11).

Estos resultados corroboran la importancia de la temperatura de extracción en la implementación de PLE para obtener mayores rendimientos.

3.3.2 Análisis de las variables CTF y CTFI

El mayor valor de CTF se encontró en el ensayo #12 del diseño experimental (109,34 mg AGE/g extracto), el cual se obtuvo a 150 °C - 100% EtOH, seguido del ensayo #4 (106,87 mg AGE/g extracto) obtenido a 100 °C - 100% EtOH. Esta variable está altamente influenciada, de forma directa, por el aumento de la temperatura y en menor medida por el contenido de EtOH como se muestra en la **Figura 3-2**. En la **Tabla 3-4** se observa los datos de CTF, CTFI y TEAC, reportados como mg/g de extracto y mg/100 g de muestra; (más detalles son especificados en el **Apéndice B-7**).

Tabla 3-4. Datos obtenidos CTF, CTFI y TEAC en extractos PLE obtenidos de PP.

Ensayo	CTF (mg AGE/g extracto)	CTF (mg AGE/100 g muestra)	CTFI (μg QE/g extracto)	CTFI mg QE/100 g muestra	TEAC (mg TE/g extracto)	TEAC (mg TE/100 g muestra)
1	96,82 ± 2,93	3426,45 ± 103,78	14,33 ± 0,32	0,50 ± 0,01	277,50 ± 20,00	9820,72 ± 709,30
2	82,59 ± 4,40	1402,37 ± 73,31	12,20 ± 0,59	0,20 ± 0,01	80,00 ± 2,38	1358,40 ± 40,49
3	85,00 ± 1,24	1285,20 ± 18,82	13,57 ± 0,81	0,20 ± 0,01	135,00 ± 5,92	2041,20 ± 89,58
4	106,87 ± 3,86	1040,91 ± 37,55	13,28 ± 0,33	0,12 ± 0,01	115,00 ± 9,04	1120,10 ± 88,06
5	77,02 ± 0,71	1170,70 ± 10,84	9,29 ± 0,74	0,14 ± 0,01	107,50 ± 6,07	1634,00 ± 92,25
6	98,15 ± 1,27	2764,88 ± 17,92	6,85 ± 0,33	0,19 ± 0,01	247,50 ± 10,75	6972,07 ± 302,83
7	84,76 ± 4,56	1338,36 ± 72,00	13,37 ± 0,13	0,21 ± 0,01	105,00 ± 10,75	1657,95 ± 169,88
8	92,75 ± 4,21	1516,46 ± 69,03	16,88 ± 0,95	0,27 ± 0,02	142,50 ± 10,96	2329,87 ± 179,26
9	68,34 ± 3,27	386,12 ± 18,52	8,04 ± 0,30	0,04 ± 0,01	77,50 ± 5,38	437,87 ± 30,41
10	54,38 ± 4,10	366,52 ± 24,89	10,66 ± 0,82	0,07 ± 0,03	40,00 ± 0,14	269,60 ± 5,24
11	67,88 ± 2,31	591,91 ± 20,16	17,92 ± 1,00	0,15 ± 0,01	125,00 ± 5,78	1090,00 ± 50,24
12	109,34 ± 4,66	1989,98 ± 84,83	15,50 ± 0,65	0,28 ± 0,01	247,50 ± 18,43	4504,50 ± 335,47
13	80,55 ± 2,03	1304,10 ± 32,85	13,91 ± 0,29	0,22 ± 0,01	77,50 ± 5,29	1254,72 ± 85,67

El diagrama de Pareto evidencia la relación existente entre la temperatura y el CTF, por su parte, la superficie de respuesta muestra como el aumento de la temperatura de extracción favorece el CTF. Este comportamiento es debido al aumento en la transferencia de masa, propio de incrementar la temperatura de extracción.

Otros autores han reportado el mismo comportamiento en la PP, por ejemplo Shang et al. (2017), encontraron 6,99 y 24,14 mg AGE/g extracto a 80 y 160 °C, respectivamente (12), manteniendo las mismas condiciones de tiempo, presión y % EtOH. Asimismo, Narita et al. (2012), obtuvo un incremento de CTF (36 – 123 mg AGE/g extracto) al aumentar la temperatura (25 – 270 °C) (9). Cabe resaltar que el valor obtenido en el presente trabajo (109 mg AGE/g extracto) es superior al obtenido en trabajos previos.

Otros autores obtuvieron resultados similares con otras biomásas de café, Oliveira et al. (2018), con el grano de café verde arábico de Brasil obtuvo un aumento de CTF (26,27-27,96 mg AGE/g extracto) al aumentar la temperatura (44-74 °C) y Miron et al. (2019), con café arábico de México encontró que al variar la temperatura (45-75°C) su CTF aumentaba (0,59-2,15 mg AGE/g extracto) (10,11). Para los dos casos se reportaron valores inferiores a los obtenidos en este trabajo.

Por otro lado para el CTFI se obtuvo un valor máximo (17,92 µg QE/g extracto) en condiciones de 50 °C y 100% EtOH y un mínimo (6,85 µg QE/g extracto) en condiciones de 150 °C y 0% EtOH. Siendo el factor más influyente en este caso el % EtOH (ver **Figura 3-3**), un aumento de éste en la fase extractante, produce un CTFI mayor. Este comportamiento coincide con el observado en otros estudios, donde el uso de EtOH mejora la extracción de flavonoides (13). Hasta donde se tiene conocimiento, no hay estudios previos del CTFI en la PP, para otras biomasa de café se han obtenido valores que no se pueden comparar con lo obtenido, ya que, otros autores contrastan con epicatequina, catequina y rutina, así como los que contrastan con quercetina usan métodos de extracción convencionales.

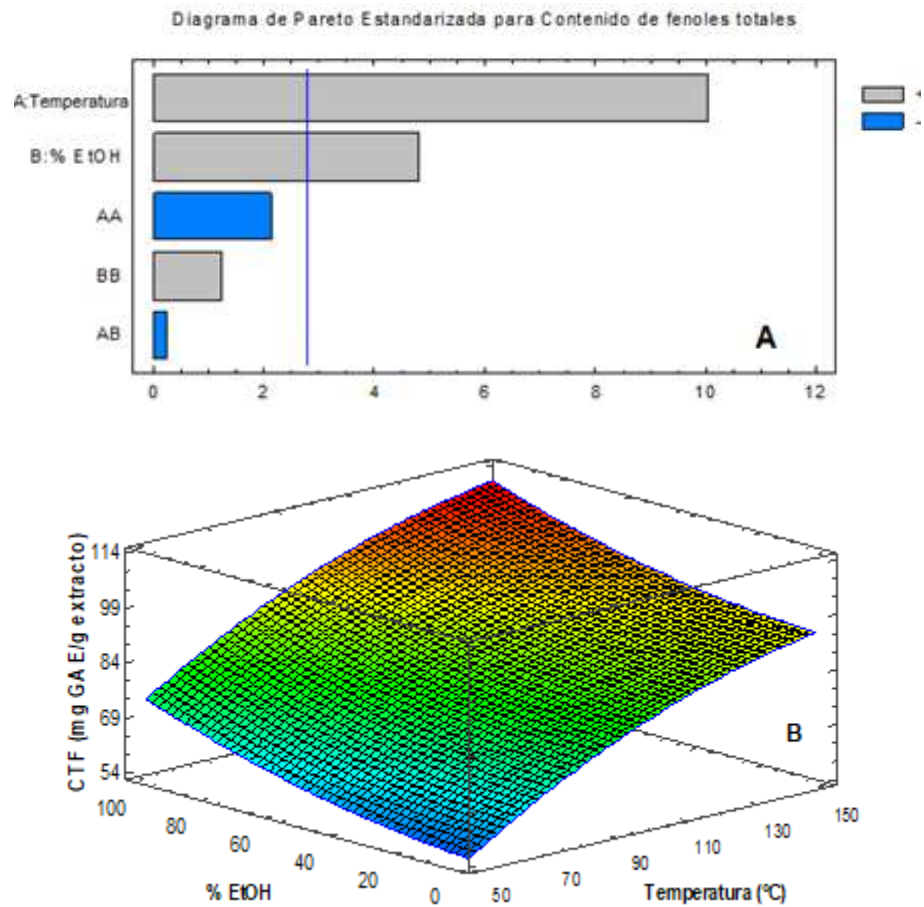


Figura 3-2. Diagramas de Pareto Estandarizado (A) y Superficie de respuesta (B) para la variable de respuesta CTF.

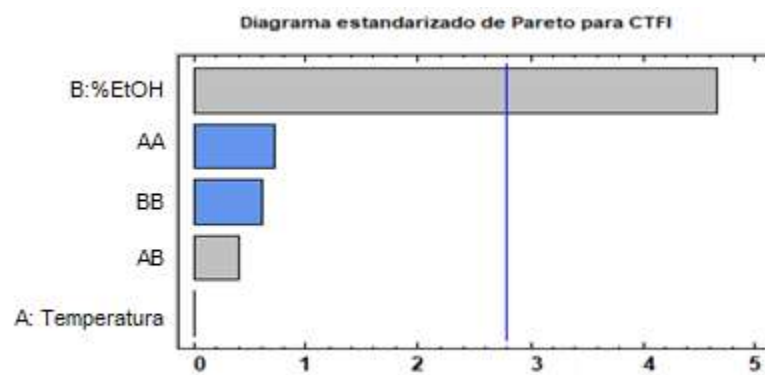


Figura 3-3. Diagramas de Pareto Estandarizado para CTFI

3.3.3 Determinación de capacidad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante por el método TEAC presentó a 150 °C-50% EtOH un valor de 9820,72 mg TE/100 g muestra (277,50 mg TE/g extracto), y a 50 °C-0% EtOH un valor de 269,2 mg TE/100 g muestra (40,00 mg TE/g extracto). En las **Figura 3-4 (A)** y **3-5**, se observa la influencia de la temperatura sobre la capacidad antioxidante evaluada por el método TEAC. Datos más detallados se encuentran en el **Apéndice B-8**.

Para la capacidad antioxidante evaluada por el método EC_{50} se encontró que el disolvente es la variable más influyente, como se observa en el diagrama de Pareto de la **Figura 3-4 (B)**, ya que lo que se busca por este método es el valor más bajo, se encuentra una influencia negativa, que para este caso es lo requerido. Obteniendo resultados de 21,89–35,68–73,41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a la misma temperatura y variando el % disolvente de 100-50-0% EtOH respectivamente.

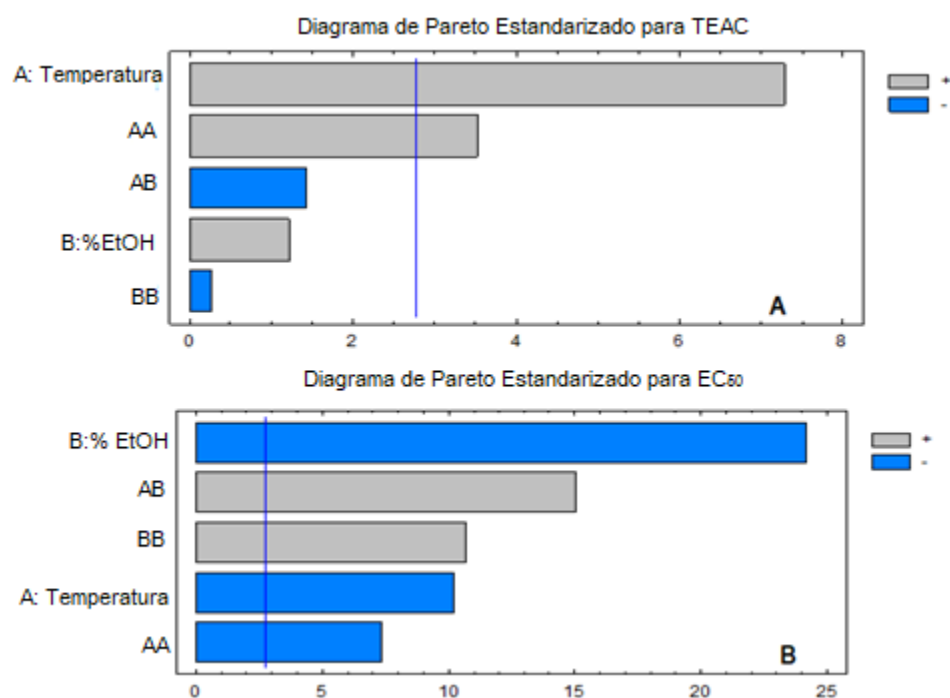


Figura 3-4. Diagramas de Pareto Estandarizado para las variables de respuesta TEAC (A) y EC_{50} (B).

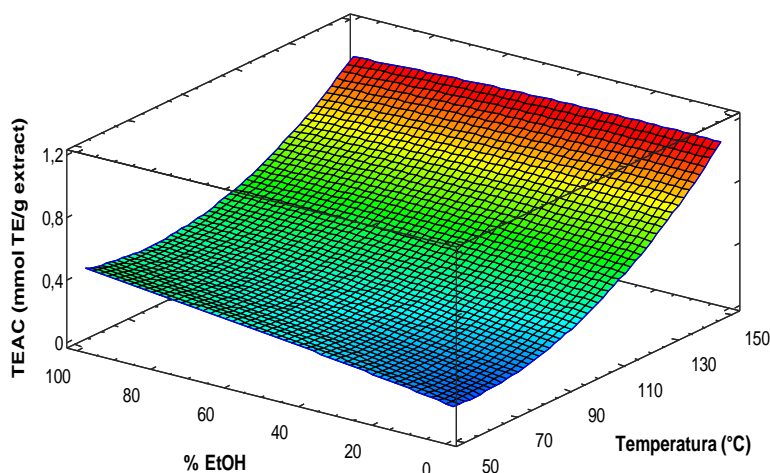


Figura 3-5. Superficie de respuesta para la variable de respuesta TEAC.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos en otras biomásas de café por otros autores, como es el caso de Miron et al. (2019), quienes obtuvieron en cascara de café un aumento en la capacidad antioxidante evaluada por el método TEAC (2,5-5,3 g TE/100 g muestra) a medida que aumentó la temperatura (45-75 °C) (10).

Las altas temperaturas de extracción favorecieron la obtención de compuestos bioactivos, ya que el aumento de la temperatura incrementa la solubilidad de los componentes a estudiar generando una mayor penetrabilidad sin afectar los compuestos bioactivos lábiles (13).

Por otro lado para la capacidad antioxidante evaluada por el método EC_{50} se encontró un estudio realizado al grano de café, en el que comparaba el aumento del EC_{50} (36,5-51,2 $\mu\text{g/ml}$) a medida que aumentaba la temperatura (50-70 °C) (11), mostrando así que ese factor no es influyente para obtener mejores resultados. Igualmente se observa que los valores obtenidos son mayores a los encontrados en grano de café verde (14,23 $\mu\text{g/ml}$) grano de café tostado (12,04 $\mu\text{g/ml}$) y borra de café (10,58 $\mu\text{g/ml}$).

Un estudio realizado por Andrade et, al. destacó que extractos etanólicos obtenidos mediante ultrasonido y Soxhlet presentaron mayor capacidad antioxidante por el método EC_{50} , comparado con extractos obtenidos con otros disolventes como hexano, diclorometano, acetato de etilo y dióxido de carbono supercrítico, empleando como biomasa borra de café (235,40 $\mu\text{g/ml}$) y cascara de café (537,37 $\mu\text{g/ml}$) (14).

En general los valores obtenidos de EC_{50} , en el presente trabajo (**Tabla 3-3**) fueron menores a los reportados para otros subproductos de café y mayores que lo reportados para el café tostado.

De acuerdo al análisis anterior, las condiciones de extracción que maximizan las variables respuesta CTF, CTFI y TEAC a través de la optimización de múltiples variables (**Tabla 3-5**), fueron 150 °C-100% EtOH. La combinación de niveles y factores maximiza la función de deseabilidad ($R^2=0,890$), esto hace que se alcance un óptimo de extracción, con valores experimentales de CTF (109,34 mg AGE/g extracto), CTFI (15,50 µg QE/g extracto) y TEAC (1,11 mmol TE/g extracto).

De esta forma los valores estimados de las respuestas por la optimización de múltiples variables son similares a los obtenidos experimentalmente a estas condiciones (Ensayo #12, **Tabla 3-2**), generando porcentajes de desviación relativa estándar (% DRE) de alrededor de 1%.

Tabla 3-5. Valores estimados y valores experimentales obtenidos en la validación de la optimización del diseño experimental.

<i>Respuesta</i>	<i>Estimado</i>	<i>Experimental</i>	<i>% DRE</i>
Contenido de fenoles totales (mg de AGE/g de extracto)	111,10	109,34	1,58
Contenido Total de Flavonoides (µg QE/g de extracto)	15,68	15,50	1,16
TEAC (mmol TE/g de extracto)	1,00	0,99	1,00

Desviación relativa= [(valor experimental – valor estimado)/ valor experimental]*100

3.4 Conclusiones

En este capítulo se evaluó el efecto de las condiciones de extracción (temperatura y % de EtOH en mezcla extractante) en los extractos PLE obtenidos a partir de PP, empleando como parámetros del proceso 10,0 MPa, 20 min de extracción, 1,4 g de muestra y una cantidad de disolvente de 15 ml, sobre distintas variables respuesta (rendimiento de extracción, CTF, CTFI, y capacidad antioxidante *in vitro* por los métodos TEAC y EC₅₀), encontrando que:

- Un aumento en la temperatura de extracción provocó un mayor rendimiento de extracción (35,39%), un mayor contenido de compuestos fenólicos (109,34 mg AGE/g extracto) y una alta capacidad antioxidante evaluada por el método TEAC (247,50 mg TE/g extracto). Por su parte, la variable porcentaje de EtOH tuvo un efecto positivo en el contenido total de flavonoides (17,92 µg QE/g extracto) y la capacidad antioxidante evaluada por el método EC₅₀ (21,89 µg/ml).
- La optimización del proceso de obtención de extractos bioactivos a partir de PP usando PLE concluyó que las mejores condiciones de extracción para maximizar las variables evaluadas, fueron 150 °C - 100% EtOH, logrando un rendimiento de extracción del 18,20%. Los valores predichos por el análisis estadístico para las variables de respuesta (111,10 mg AGE/g extracto, 15,68 µg QE/g extracto y 1,00 mmol TE/g extracto) son similares a los obtenidos experimentalmente (109,34 mg AGE/g extracto, 15,50 µg QE/g extracto y 0,99 mmol TE/g extracto), validando así la idoneidad de la optimización de múltiples variables llevada a cabo.

Referencias

1. Alvarez-Rivera G, Bueno M, Mendiola JA, Ibanez E. Pressurized Liquid Extraction. In: Liquid Phase Extraction [Internet]. Madrid; 2020. p. 375–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012816911700013X?via%3Dihub>
2. Sánchez-Camargo AP. Desarrollo de nuevas estrategias de extracción para la obtención de compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. [Internet]. 2017. 16-45 p. Available from: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/679026>
3. Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;703:8–18.
4. Kosar M, Dormana HJD, Hiltunena R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem*. 2005;91:525–33.
5. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152–78.
6. Hosu A, Cristea V, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks,”. *Food Chem*. 2014;150:113–8.
7. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231–7.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci Technol*. 1995;22:25–30.
9. Narita Y, Inouye K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chem*. 2012;135:943–9.
10. Mirón-Mérida V, Yáñez-Fernández J, Montañez-Barragán B, Barragán B. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *LWT - Food Sci Technol*. 2019;101:167–74.
11. Oliveira NA, Cornelio-Santiago HP, Fukumasu H, Lopes de Oliverira A. Green coffee extracts rich in diterpenes - Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *J Food Eng*. 2018;224:148–55.
12. Shang Y, Xu J, Lee W, Um B. Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African J Bot*. 2017;109:75–80.
13. Herrero M, Sánchez-camargo AP, Cifuentes A, Ibáñez E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends Anal Chem*.

2015;71:26–38.

14. Andrade KS, Gonçalves RT, Maraschin M, Ribeiro-do-valle RM, Martínez J, Ferreira SRS. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*. 2012;88:544–52.

4. Extracciones sucesivas realizadas a la película plateada de café para lograr su agotamiento.

En este capítulo se define el número de ciclos de extracción PLE al que se sometió la PP para lograr su agotamiento. Cada ciclo de extracción se realizó de forma estática por 20 minutos a 10,0 MPa, sobre 1,4000 g de biomasa, empleando como parámetros de extracción las condiciones óptimas obtenidas anteriormente (150 °C, 100% EtOH). A cada ciclo de extracción se le evaluó el rendimiento, el CTF, el CTFI y la capacidad antioxidante *in vitro*. Con cuatro ciclos de extracción se logró un rendimiento acumulado de 28,68% en extracto, pasando del 18,40 al 1,32% de rendimiento del primer al cuarto ciclo de extracción. Del mismo modo, el CTF y el CTFI pasaron de 1341,91 a 100,61 mg AGE/100 g muestra y 0,23 a 0,01 mg QE/100 g muestra, respectivamente. Respecto a la capacidad antioxidante *in vitro*, entre el primer y el cuarto ciclo de extracción, el EC₅₀ pasó 26,79 a 39,04 µg/ml y TEAC bajo de 5078 a 281 mg TE/100 g muestra. Los comportamientos antes descritos muestran el agotamiento que se logra sobre la biomasa.

4.1. Introducción

En la técnica de extracción con líquidos presurizados, se deben tener en cuenta ciertas condiciones de extracción, tales como: la matriz, el disolvente, la temperatura, el flujo, la presión y el tiempo de extracción y el número de ciclos de extracción a realizar. Este último corresponde al necesario para agotar la muestra. El tiempo de extracción dependerá del modo de extracción que se desea implementar (estática o dinámica) (1,2). En la extracción estática un volumen dado de disolvente se deja en contacto con la muestra en condiciones específicas durante un periodo de tiempo que en general es relativamente corto (5 – 20 minutos), ya que tiempos más largos no producen mejores resultados (3). Muchas veces en la extracción estática, se emplea más de un ciclo de extracción, así se logra un equilibrio entre los compuestos que se encuentran en la matriz y la fase líquida en la que están disueltos los analitos. Estos ciclos generalmente cortos de extracción pueden ayudar a agotar la matriz de manera eficaz (3), pero algunas veces estas extracciones sucesivas puede acarrear consigo que la eficacia de la extracción no aumente y que se generen reacciones químicas no deseadas, por eso es importante conocer el tiempo de agotamiento de la muestra y así minimizar el tiempo de extracción evitando una posible degradación térmica de los compuestos (1,4).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Obtención de extractos empleando líquidos presurizados (PLE)

El equipo de extracción con líquidos presurizados, fue el mismo descrito en el apartado 3.2.2. Para llevar a cabo las extracciones se empleó los siguientes parámetros de extracción: una temperatura de 150 °C, EtOH como disolvente, una presión de 10,0 MPa, y una cantidad de muestra de 1,4000 g. Los ciclos de extracción sucesivos se llevaron a cabo de forma estática por periodos de extracción de 20 minutos, recuperando el extracto al final de cada ciclo. Se realizaron cuatro ciclos de extracción hasta completar 80 minutos de tiempo de extracción acumulado. Las extracciones fueron realizadas por triplicado. Luego el disolvente fue eliminado del extracto por rotaevaporación. El extracto fue protegido de la luz y almacenado a -10 °C, hasta la realización de los análisis posteriores.

4.2.2. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos (CTF)

La determinación del CTF fue realizada de acuerdo a la metodología descrita en el ítem 2.2.4. (5,6)

4.2.3. Cuantificación del contenido total de flavonoides (CTFI).

La determinación del CTFI, fue realizada de acuerdo a la metodología descrita en el ítem 3.2.4 (7)

4.2.4. Determinación de capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* se implementaron los métodos descritos en los ítems 2.2.5 (TEAC) y 3.2.5 (EC₅₀) (8,9).

4.2.5. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los rendimientos se expresaron como el porcentaje en masa (%w/w). Los CTF, CTFI y capacidad antioxidante *in vitro* por TEAC y EC₅₀, fueron realizados por triplicado.

4.3. Resultados y discusiones

4.3.1. Extracciones sucesivas y rendimientos

Las extracciones sucesivas realizadas a la misma biomasa, dieron como resultado una variación en el rendimiento (ver **Tabla 4-1**). A medida que se realizó un nuevo ciclo de extracción la cantidad de extracto obtenido iba disminuyendo (más detalles son especificados en el **Apéndice C-1**). En la

Figura 4-1. se observa el comportamiento del rendimiento acumulado, alcanzando un valor de 28,68% al terminar el cuarto ciclo de extracción. Entre el ciclo #3 y el ciclo #4, tan solo hay un incremento del 1,37% en el rendimiento de extracción, lo cual se traduce, en una variación en rendimiento inferior al 5% del total acumulado. Por tanto se tomó como criterio, que continuar con más ciclos de extracción solo acarrearía más tiempo y consumo de disolvente y no un aumento másico significativo en la obtención de extracto. Teniendo en cuenta lo anterior, el ciclo #4 fue asumido como el tiempo (80 min) de agotamiento de la muestra (10,11).

Tabla 4-1. Rendimientos obtenidos en las extracciones sucesivas

Ciclo “n” de extracción	Tiempo (min)	Rendimiento de extracción (%)	Rendimiento acumulado de extracción (%)
1	20	18,40 ± 0,69	18,40
2	40	5,93 ± 0,43	24,33
3	60	2,98 ± 0,33	27,31
4	80	1,37 ± 0,16	28,68

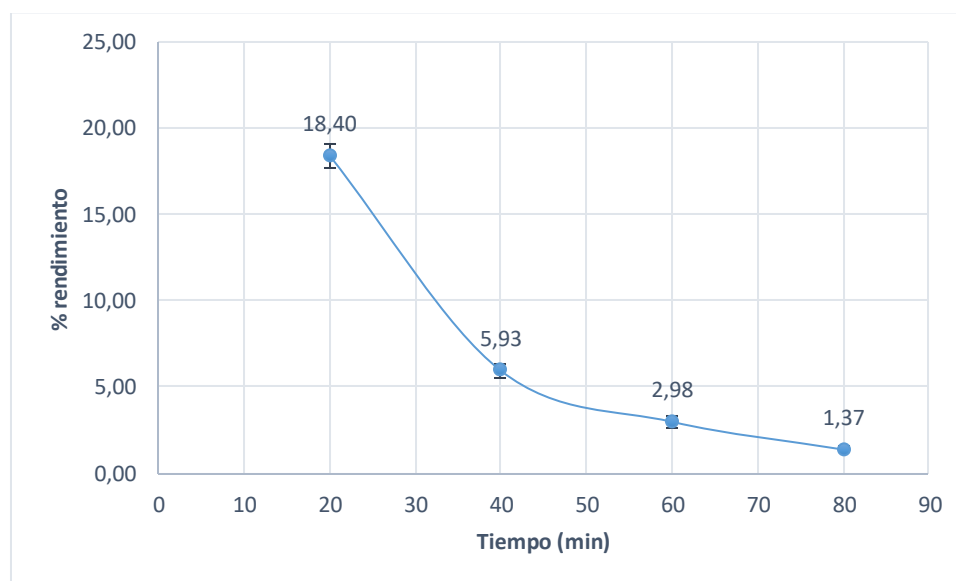


Figura 4-1. Rendimiento acumulado de extracción vs ciclo de extracción.

El primer rendimiento de extracción (18,40%) obtenido en esta fase, es similar al obtenido en el capítulo anterior bajo las mismas condiciones (150 °C-100%EtOH) (18,20%). Estos valores son

mayores a los obtenidos por técnicas convencionales de extracción, tales como Soxhlet, maceración, entre otras. El rendimiento en este caso fue similar al reportado por otros autores, donde se observa que el aumento de la temperatura genera mayor rendimiento; en extracciones realizadas a la PP empleando agua subcrítica (a 25 °C a 210 °C- 16 a 29%) (12).

4.3.2. Cuantificación del contenido total de compuesto fenólicos y flavonoides en las extracciones sucesivas.

Los resultados obtenidos para el CTF y CTFI en los extractos de cada ciclo de extracción, se observan en la **Tabla 4-2** (más detalles son especificados en el **Apéndice C-2**).

Para el CTF se encontró que su valor aumentaba en cada ciclo de extracción hasta un valor máximo en el ciclo tres (84,49 mg AGE/g de extracto), en el siguiente ciclo dicho valor disminuyó (73,44 mg AGE/g extracto), Por su parte, el CTFI por g de extracto obtenido en cada ciclo de extracción presentó ligeros cambios, disminuyendo continuamente (desde 12,78 a 9,39 µg QE/g extracto, del primer al último ciclo). Al registrar estos datos respecto a 100 g de muestra, se encuentran descensos continuos en el CTF y en el CTFI, con cada ciclo de extracción; en el último ciclo el CTF no supera el 8% y el CTFI fue inferior al 5% ver **Figura 4-2** y **Figura 4-3**.

La extracción sucesiva o por ciclo que se realizó, además de aumentar el rendimiento acumulado de extracción, logra aumentar la extracción de CTF y CTFI. Lo anterior está en consonancia con lo reportado por Luthria, quien al implementar cuatro extracciones consecutivas consigue aumentar el CTF de extracto de perejil, en comparación con un solo ciclo de extracción (4,13–15). Para la PP no se han realizado estudios similares en los que involucren varios ciclos de extracción, para las demás biomásas de café tampoco se han reportado este tipo de estudios.

Tabla 4-2. Contenido total de compuesto fenólicos y flavonoides en extracciones sucesivas.

Ciclo “n” de extracción	Tiempo (min)	mg de AGE/g extracto	mg de AGE/100 g muestra	µg QE/g extracto	mg QE/100 g de muestra
1	20	72,93 ± 0,51	1341,91 ± 9,38	12,78 ± 0,42	0,23 ± 0,01
2	40	75,73 ± 4,12	449,07 ± 24,49	11,40 ± 0,79	0,06 ± 0,01
3	60	84,49 ± 5,71	251,78 ± 17,00	10,87 ± 1,03	0,03 ± 0,01
4	80	73,44 ± 7,16	100,61 ± 9,81	9,34 ± 0,85	0,01 ± 0,01

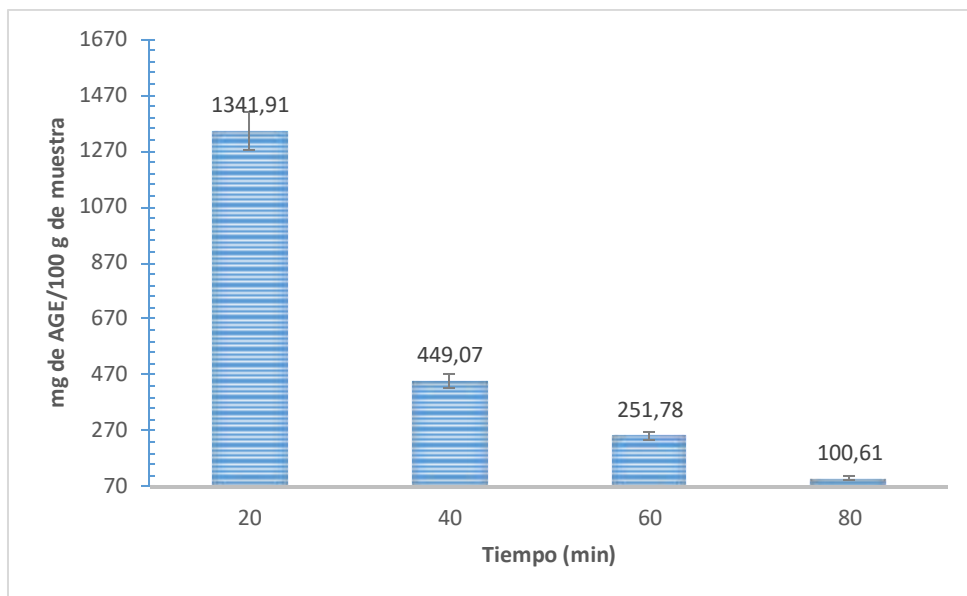


Figura 4-2. Contenido total de fenoles en la PP respecto al tiempo de extracción

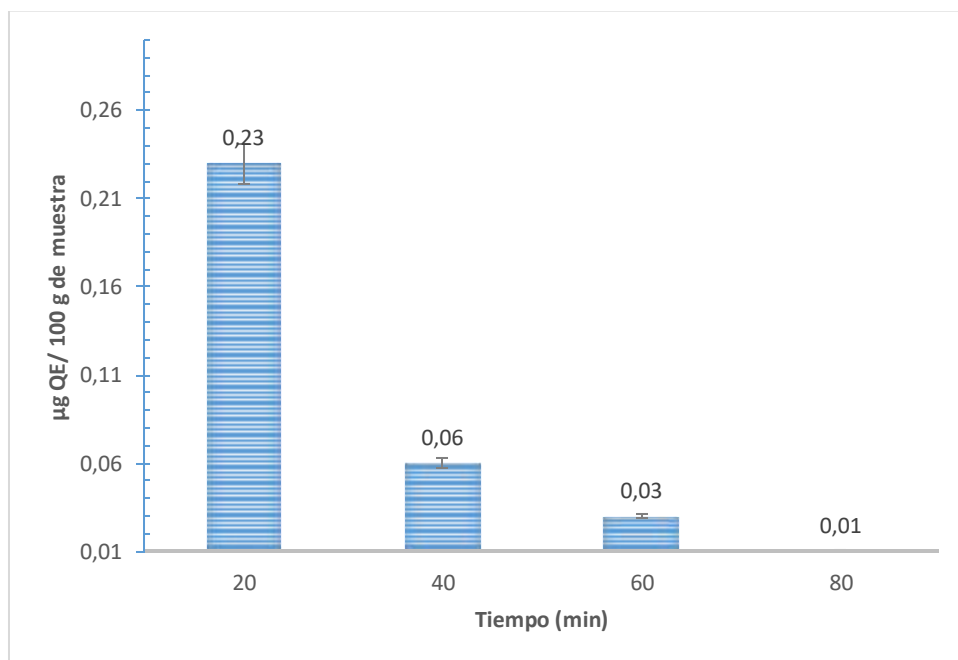


Figura 4-3. Contenido total de flavonoides en la PP respecto al tiempo de extracción.

Los valores de CTF y CTFI son menores a los obtenidos en el capítulo 3 (109,34 mg AGE/g extracto y 15,50 µg QE/g extracto) bajo las mismas condiciones de extracción. Al comparar los resultados con los obtenidos por otros autores se encuentra que sigue siendo mayor el CTF, ya que se ha reportado valores máximos de 35,99 mg AGE/g extracto, a condiciones de temperatura menores

(60 °C) para granos de café (4). En el caso de CTFI no se encontraron estudios realizados para la PP o para otros subproductos de café que tengan como sustancia de comparación, la quercetina.

4.3.3. Capacidad antioxidante *in vitro*

En la **Tabla 4-3**, se observan los valores obtenidos para la capacidad antioxidante *in vitro* evaluada por los métodos EC₅₀ y TEAC, en ambos se obtuvo una disminución en la capacidad antioxidante en cada ciclo nuevo de extracción que se realiza adicionalmente ver **Figuras 4-4 y 4-5** (el aumento del EC₅₀ indica que disminuye la capacidad antioxidante). Más detalles son especificados en el **Apéndice C-3**.

Tabla 4-3. Capacidad antioxidante evaluada por EC₅₀ y TEAC.

Ciclo "n" de extracción	EC ₅₀ μg/ml	TEAC mg TE/g extracto	TEAC mg TE/100 g de muestra
1	26,79 ± 1,67	276,00 ± 4,75	5078,40 ± 87,38
2	30,34 ± 0,89	232,25 ± 3,75	1377,24 ± 22,26
3	34,8 ± 3,17	209,00 ± 8,75	622,82 ± 26,04
4	39,04 ± 2,41	205,50 ± 9,75	281,53 ± 13,35

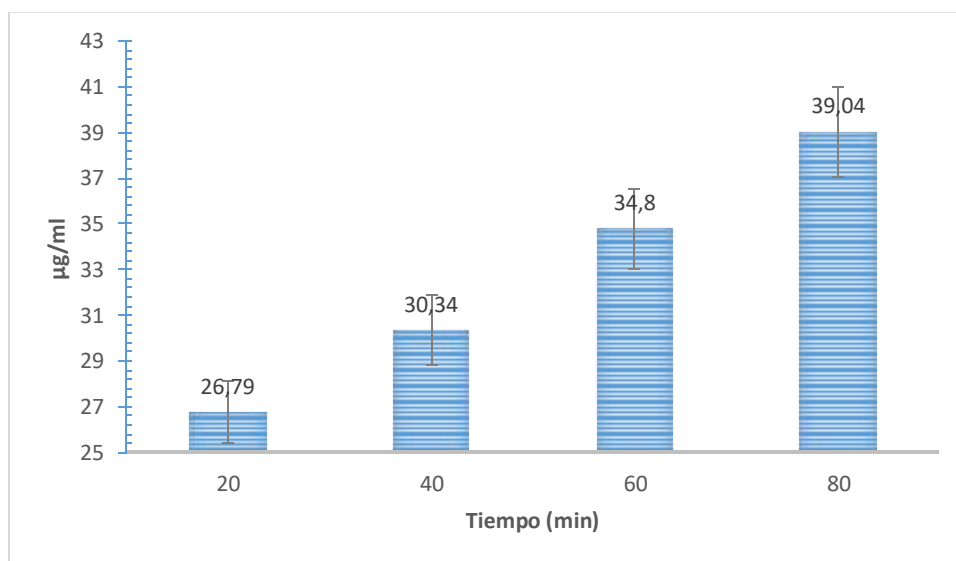


Figura 4-4. Capacidad antioxidante por método EC₅₀ vs tiempo de extracción.

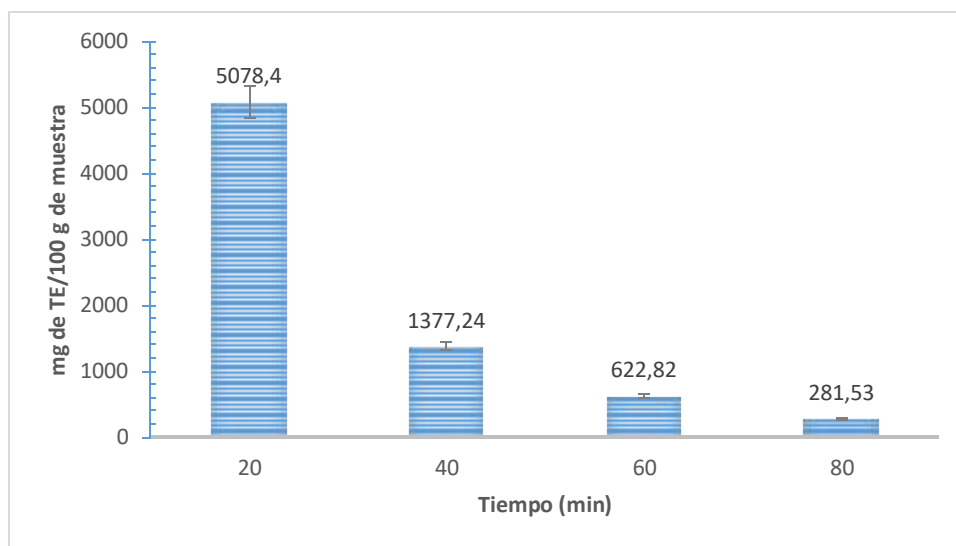


Figura 4-5. Capacidad antioxidante por el método TEAC vs tiempo de extracción.

Los valores de capacidad antioxidante *in vitro* obtenidos en esta parte de la investigación (276,00 TE/g extracto y 26,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$) son similares a los obtenidos en el capítulo anterior (247,50 mg TE/g extracto y 26,74 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para otros autores el valor de EC_{50} fue menor (23,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al evaluar granos de café verde (16). Para TEAC se ha reportado a 75 °C y 100% EtOH valores inferiores (1,50 mg TE/g extracto)(17). Se reitera que no se encontraron estudios de extracción sucesiva para la PP, generando una comparación solamente con el primer punto de extracción.

Debido al descenso significativo de todas las variables (rendimiento de extracción, CTF, CTFI, capacidad antioxidante *in vitro* evaluada por TEAC y EC_{50}) se encuentra que cuatro ciclos de extracción con EtOH a 150 °C son suficientes para generar un agotamiento de la muestra (PP), más extracciones solo acarrearían un gasto de energía y disolvente innecesario.

4.4. Conclusiones

- El proceso de extracciones sucesivas, que se realizó empleando las condiciones óptimas obtenidas en el capítulo anterior, permitió el agotamiento de la muestra con cuarto ciclo de extracción.
- Al comparar las variables de respuesta se logró un aumento significativo en el rendimiento, con relación a lo realizado en un solo ciclo (18,40 a 28,68%). Respecto a las demás variables se mostró un claro agotamiento de la muestra, disminuyendo en el contenido total de fenoles (de 1341,91 a 100,61 mg AGE/100 g muestra), contenido total de flavonoides (de 0,23 a 0,01 mg QE/100 g muestra) y la capacidad antioxidante *in vitro* evaluada por el método TEAC (de 5078,40 a 281,53 mg TE/100 g muestra), EC_{50} (de 26,79 a 39,04 $\mu\text{g/ml}$).

Referencias

1. Alvarez-Rivera G, Bueno M, Mendiola JA, Ibanez E. Pressurized Liquid Extraction. In: Liquid Phase Extraction [Internet]. Madrid; 2020. p. 375–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012816911700013X?via%3Dihub>
2. Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;703:8–18.
3. Sánchez-Camargo AP. Desarrollo de nuevas estrategias de extracción para la obtención de compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. [Internet]. 2017. 16-45 p. Available from: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/679026>
4. Oliveira NA, Cornelio-santiago HP, Fukumasu H, Lopes de Oliverira A. Green coffee extracts rich in diterpenes - Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *J Food Eng*. 2018;224:148–55.
5. Kosar M, Dormana HJD, Hiltunena R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem*. 2005;91:525–33.
6. Singlet VL, Orthofer R, Lamuela R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152–78.
7. Hosu A, Cristea V, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks,”. *Food Chem*. 2014;150:113–8.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231–7.
9. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci Technol*. 1995;22:25–30.
10. Mezzomo N, Martinez J, Ferreira S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *J Supercrit Fluids Supercritical*. 2009;51:10–6.
11. Ballesteros-Vivas D. Estudio comparativo sobre la obtención de extractos con actividad citotóxica a partir de residuos frutícolas. Tesis de maestría. [Internet]. Bogota; 2015. 25-33 p. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/52021/>
12. Narita Y, Inouye K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chem*. 2012;135:943–9.
13. Reverchon E, Marrone C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *J Supercrit Fluids*. 2001;19:161–75.

14. Luthria D. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chem.* 2008;107:745.
15. Herrero M, Iban E, Mendiola A. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends Anal Chem.* 2013;43:67–83.
16. Shang Y, Xu J, Lee W, Um B. Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African J Bot.* 2017;109:75–80.
17. Mirón-mérida V, Yáñez-fernández J, Montañez-barragán B, Barragán B. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *LWT - Food Sci Technol.* 2019;101:167–74.

5. Conclusiones generales

El contenido nutricional de los subproductos de café es de gran interés para la industria alimentaria, en especial por su alto contenido de fibra, pues pueden ser empleados para generar alimentos funcionales. En particular, el perfil nutricional de la película plateada-PP se destacó dentro de los dos subproductos evaluados, puesto que su contenido en grasa, cenizas y proteína es importante, además de presentar un alto contenido de fibra soluble (12,6%).

La extracción con líquidos presurizados, técnica de extracción no convencional, es eficaz para la obtención de extractos bioactivos a partir de la PP del café. Estos extractos presentaron un importante rendimiento de extracción (35,39%), así como relevantes contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides (109,34 mg AGE/g extracto y 17,92 µg QE/g extracto) y una destacada capacidad antioxidante *in vitro* (247,50 mg TE/g extracto y EC₅₀ de 21,89 µg/ml), respecto a extractos obtenidos por métodos de extracción convencional. Las condiciones que permitieron obtener el extracto más promisorio a partir de la PP fueron 100% de etanol a 150 °C.

El estudio del número de ciclos de extracción necesarios para el agotamiento de la muestra, mostró que con cuatro ciclos de extracción (para un total de 80 min de extracción) el rendimiento de extracción mejoró un 55,9%. Asimismo, se observó que los componentes de todos los ciclos de extracción presentan una importante capacidad antioxidante *in vitro*.

Finalmente, es importante resaltar que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la película plateada de café es una interesante fuente dietaria y de compuestos fenólicos, adicionalmente la torta remanente presenta una cantidad importante de fibra dietaria. Lo anterior permite ver con doble propósito a la PP (como fuente de extractos con actividad antioxidante y como fuente de fibra).

6. Recomendaciones

Una vez alcanzados los objetivos planteados en el proyecto de tesis de maestría, surgen una serie de sugerencias que pueden aportar a la consecución de resultados más amplios y profundos; por lo tanto se recomienda a futuros interesados en el tema:

- Efectuar caracterización química de los extractos obtenidos, además de explorar otros tipos de bioactividades tales como anti-proliferativo y antiinflamatorio, entre otros.
- Evaluar la factibilidad económica de realizar este tipo de procesos en la industria, para conocer las ventajas de emplear estos extractos como aditivos alimentarios.
- Realizar un estudio similar al presentado en el capítulo 3, para la cascarilla de café, pues a pesar de no tener un perfil nutricional como el de la PP, es preciso valorizar su uso en la industria alimenticia.
- Realizar un screening fitoquímico de los extractos para conocer los metabolitos secundarios presentes en dichos extractos, y así establecer a que compuestos podría estar asociada la capacidad antioxidante encontrada en la PP.
- Implementar la torta remanente de la extracción como posible fuente de alimentos funcionales, tales como panes, galletas o snacks saludables con alto contenido de fibra dietaria.

Anexos

En este apartado se presentan los productos académicos mediante los cuales se ha divulgado los resultados obtenidos (Anexo A) e información complementaria que ha sido referida en el desarrollo del documento (Anexos B y C).

A. Divulgación de resultados

B. Comparación del efecto de la temperatura y fracción de disolvente sobre las variables de respuesta.

C. Evaluación del efecto de tiempo por etapas sucesivas.

A. Divulgación de resultados

Participación en eventos

- **II Congreso de Química del Caribe. (2019). Modalidad Oral.** Ana Milena Escamilla; Mabel Martínez; Andrea del Pilar Sánchez-Camargo; Fabián Parada-Alfonso. Análisis Proximal de dos subproductos derivados del beneficio del café en Colombia.
- **XVIII Congreso Colombiano de Química. (2019). Modalidad Oral.** Ana Milena Escamilla; Andrea del Pilar Sánchez-Camargo; Fabián Parada-Alfonso. Extracción de compuestos fenólicos y flavonoides de la película plateada de café empleando técnicas verdes de extracción.
- **I Encuentro Ibérico de Fluidos Supercríticos. (2020). Modalidad Poster.** A.M. Escamilla-Santos; A.D.P. Sánchez-Camargo; M. Martínez-Rodríguez; G. Alvarez-Rivera; S.R.S. Ferreira; A. Cifuentes; E. Ibañez; F. Parada-Alfonso. Colombian coffee silverskin as source of bioactive extracts.

B. Comparación de los efectos de temperatura y fracción de disolvente sobre las variables de respuesta.

B-1. Análisis de varianza para rendimiento modelo estadístico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperaatura	626,502	1	626,502	1326,11	0,0000
B:% EtOH	27,2095	1	27,2095	57,59	0,0016
AA	36,9471	1	36,9471	78,21	0,0009
AB	39,7864	1	39,7864	84,22	0,0008
BB	53,3633	1	53,3633	112,95	0,0004
Falta de ajuste	67,7301	3	22,5767	47,79	0,0014
Error puro	1,88975	4	0,472436		
Total (corr.)	829,186	12			

B-2. Análisis de varianza para CTF modelo estadístico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperaatura	2154,99	1	2154,99	100,65	0,0006
B:% EtOH	495,769	1	495,769	23,15	0,0086
AA	96,4287	1	96,4287	4,50	0,1011
AB	1,33402	1	1,33402	0,06	0,8152
BB	32,992	1	32,992	1,54	0,2823
Falta de ajuste	202,125	3	67,375	3,15	0,1486
Error puro	85,6462	4	21,4115		
Total (corr.)	3040,99	12			

B-3. Análisis de varianza para CTFI modelo estadístico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperaatura	0,000610042	1	0,000610042	0,00	0,9894
B:% EtOH	66,0713	1	66,0713	21,75	0,0096
AA	1,55619	1	1,55619	0,51	0,5138
AB	0,483651	1	0,483651	0,16	0,7103
BB	1,17277	1	1,17277	0,39	0,5681
Falta de ajuste	47,1571	3	15,719	5,17	0,0731
Error puro	12,1537	4	3,03843		
Total (corr.)	130,263	12			

B-4. Análisis de varianza para TEAC modelo estadístico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperaatura	0,750481	1	0,750481	52,98	0,0019
B:% EtOH	0,0211227	1	0,0211227	1,49	0,2891
AA	0,175728	1	0,175728	12,41	0,0244
AB	0,0283922	1	0,0283922	2,00	0,2298
BB	0,000971875	1	0,000971875	0,07	0,8063
Falta de ajuste	0,0144568	3	0,00481893	0,34	0,7988
Error puro	0,0566588	4	0,0141647		
Total (corr.)	1,06616	12			

B-5. Análisis de varianza para EC₅₀ modelo estadístico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperaatura	378,262	1	378,262	104,48	0,0005
B:% EtOH	2118,76	1	2118,76	585,24	0,0000
AA	194,368	1	194,368	53,69	0,0018
AB	821,682	1	821,682	226,96	0,0001
BB	415,544	1	415,544	114,78	0,0004
Falta de ajuste	472,2	3	157,4	43,48	0,0016
Error puro	14,4813	4	3,62033		
Total (corr.)	4265,55	12			

B-6. Resultados para la variable de rendimiento

BLOQUE	Temp	%EtOH	Rendimiento (%)					
			1	2	3	Promedio	SD	RSD
1	150	50	36,23	34,08	35,87	35,39	1,15	3,26
2*	100	50	16,39	17,81	16,74	16,98	0,74	4,37
3*	100	50	15,01	14,65	15,72	15,12	0,55	3,61
4	100	100	9,98	8,91	10,33	9,74	0,74	7,62
5	100	0	15,68	14,97	14,97	15,20	0,41	2,71
6	150	0	27,46	29,24	27,81	28,17	0,94	3,35
7*	100	50	14,25	17,46	15,68	15,79	1,61	10,17
8*	100	50	16,12	16,83	16,12	16,35	0,41	2,53
9	50	50	5,54	5,98	5,45	5,66	0,29	5,08
10	50	0	5,90	6,52	5,81	6,07	0,39	6,41
11	50	100	8,82	8,55	8,82	8,73	0,15	1,77
12	150	100	17,85	19,28	17,49	18,21	0,94	5,19
13*	100	50	13,93	17,86	16,78	16,19	2,03	12,54

B-7 Resultados para las variables de CTF y CTFI

BLOQUE	Temp	%EtOH	TPC			Flavonoides (µg QE/g Extracto)					
	°C	%	mg AGE/g extracto	SD	RSD	1	2	3	Media	SD	RSD
1	150	50	96,82	2,93	3,03	14,00	14,65	14,34	14,33	0,32	2,2
2*	100	50	82,59	4,40	5,33	12,88	11,94	11,79	12,20	0,59	4,9
3*	100	50	85,00	1,24	1,46	13,49	12,80	14,43	13,57	0,82	6,0
4	100	100	106,87	3,86	3,61	13,09	13,09	13,67	13,28	0,33	2,5
5	100	0	77,02	0,71	0,93	9,32	8,53	10,02	9,29	0,74	8,0
6	150	0	98,15	1,27	1,29	6,69	7,23	6,64	6,85	0,33	4,8
7*	100	50	84,76	4,56	5,38	13,49	13,23	13,41	13,38	0,14	1,0
8*	100	50	92,75	4,21	4,53	15,88	17,00	17,79	16,89	0,96	5,7
9	50	50	68,34	3,27	4,79	8,38	7,79	7,97	8,05	0,30	3,7
10	50	0	54,38	4,10	7,54	9,89	11,54	10,55	10,66	0,83	7,8
11	50	100	67,88	2,31	3,40	16,79	18,71	18,27	17,92	1,01	5,6
12	150	100	109,34	4,66	4,26	15,90	14,73	15,90	15,51	0,68	4,4
13*	100	50	80,55	2,03	2,52	13,83	13,75	14,16	13,92	0,29	2,1

B-8. Resultados para las variables de TEAC Y EC₅₀

BLOQUE	Temp	%EtOH	EC ₅₀			TEAC (mM TE/g Extracto)					
	°C	%	µg/ml	SD	RSD	1	2	3	Media	SD	RSD
1	150	50	29,41	1,16	3,93	1,09	1,05	1,20	1,11	0,08	7,22
2*	100	50	35,05	1,16	4,82	0,32	0,33	0,34	0,33	0,01	2,99
3*	100	50	39,17	1,15	3,96	0,52	0,57	0,53	0,54	0,02	4,62
4	100	100	21,89	1,02	4,35	0,42	0,45	0,50	0,46	0,04	7,91
5	100	0	73,41	1,88	2,53	0,42	0,41	0,46	0,43	0,03	5,72
6	150	0	28,92	3,1	10,74	0,96	1,04	1,00	1,00	0,04	4,24
7*	100	50	35,68	1,41	3,95	0,38	0,47	0,41	0,42	0,04	10,24
8*	100	50	37,59	0,5	1,34	0,54	0,56	0,62	0,57	0,04	7,63
9	50	50	24,58	1,1	4,49	0,29	0,32	0,33	0,32	0,02	5,67
10	50	0	83,39	8,47	9,83	0,17	0,17	0,17	0,17	0,00	0,17
11	50	100	24,11	1	4,11	0,47	0,51	0,51	0,50	0,02	4,67
12	150	100	26,74	1,03	4,5	0,91	1,02	1,05	0,99	0,07	7,41
13*	100	50	35,42	1,06	3	0,30	0,34	0,30	0,31	0,02	6,74

C. Evaluación del efecto de tiempo por etapas sucesivas.

C-1. Resultados para la variable de rendimiento

Bloque	Minuto	Rendimiento (%)					
		1	2	3	Promedio	SD	RSD
1	20	19,18	18,13	17,88	18,40	0,69	3,75
2	40	5,66	6,44	5,71	5,93	0,43	7,33
3	60	2,67	3,32	2,94	2,98	0,33	10,93
4	80	1,24	1,55	1,32	1,37	0,16	11,98
5	100	1,48	2,10	1,47	1,68	0,36	21,49
6	120	2,26	1,73	1,81	1,93	0,28	14,74

C-2 Resultados para las variables de CTF y CTFI

Bloque	Minuto	TPC			Flavonoides					
		mg AGE/g extracto	SD	RSD	1	2	3	µg QE/g Extracto	SD	RSD
1	20	72,93	0,51	0,70	12,47	12,62	12,26	12,78	0,42	3,30
2	40	75,73	4,13	5,47	10,51	12,02	11,68	11,40	0,79	6,90
3	60	84,49	5,71	6,76	9,79	10,96	11,86	10,87	1,04	9,60
4	80	73,45	7,17	9,76	8,36	9,79	9,87	9,34	0,85	9,10

C-3. Resultados para las variables de TEAC Y EC₅₀

Bloque	Minuto	EC ₅₀			TEAC					
		µg/ml	SD	RSD	1	2	3	mM TE/g Extracto	SD	RSD
1	20,00	26,79	1,67	6,28	1,10	1,12	1,09	1,10	0,02	1,68
2	40,00	30,34	0,86	2,82	0,92	0,93	0,94	0,93	0,02	1,56
3	60,00	34,80	3,17	8,63	0,88	0,83	0,81	0,84	0,04	4,23
4	80,00	39,04	2,41	6,16	0,81	0,87	0,79	0,82	0,04	4,76